



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA YUKA YASUMITSU

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA DE ASTROVÍRUS
SUÍNO 3 EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE SUÍNOS
COM POLIOENCEFALOMIELITE NO BRASIL**

CAROLINA YUKA YASUMITSU

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA DE ASTROVÍRUS
SUÍNO 3 EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE SUÍNOS
COM POLIOENCEFALOMIELITE NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Coorientadora: Profa. Dra. Alais Maria Dallagnol

Londrina
2025

Ficha Catalográfica

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Yasumitsu, Carolina Yuka.

Detecção e quantificação de RNA de Astrovírus suíno 3 em sistema nervoso central de suínos com polioencefalomielite no Brasil / Carolina Yuka Yasumitsu. - Londrina, 2025.
72 f.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Coorientador: Alais Maria Dall'Agnol.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2025.

Inclui bibliografia.

1. PAstV3 - Tese. 2. Mamastrovirus - Tese. 3. Doença neurológica - Tese. 4. Vírus neurotrópico - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Dall'Agnol, Alais Maria. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 578

CAROLINA YUKA YASUMITSU

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA DE ASTROVÍRUS
SUÍNO 3 EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE SUÍNOS
COM POLIOENCEFALOMIELE NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Coorientadora: Dra. Alais Maria
Dall'Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2025.

Á Deus, à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido meu alicerce inabalável.

A minha mãe, Cristiane, por ter sido apoio incondicional na minha vida acadêmica e por ter sido minha inspiração na infância, onde me lembro de assisti-la debruçada em livros por incontáveis dias e noites. Agradeço especialmente por ter me dito repetidamente ao longo da vida que no fim, tudo iria dar certo (Deus sabe que eu não acreditei em muitas ocasiões e você sempre esteve certa).

A meu avô, Mitsuo, que sempre representou o papel de pai em minha vida, e o fez com excelência, eu não seria a mesma sem seus ensinamentos. Agradeço por ter muito da sua personalidade em mim.

Tio Marcelo (*in memoriam*), você segue presente em cada parte da minha vida, espero seguir te orgulhando e agradeço infinitamente pelo pouco tempo da sua companhia física que Deus permitiu.

Tio Marcio e Tia Carla, amo vocês infinitamente, obrigada pelo melhor presente que esse mundo poderia ter recebido! As crianças são a luz da minha vida!

Aos Professores que eu admiro profundamente, Amauri e Alice Alfieri e Elis Lorenzetti pelos anos de orientação acadêmica, e especialmente a Professora Alais Dall'Agnol, que acompanhou de muito perto toda minha trajetória dentro do Laboratório de Virologia Animal, com paciência e companheirismo.

Aos meus amigos londrinenses, Marcos, Juliana, Renilda, Rafaela, Geovana e tantos outros, que foram abrigo nos dias difíceis e me acompanharam tanto nas lágrimas quanto nas felicidades. Eu não seria quem sou hoje se não fosse pelos conselhos de vocês.

A toda equipe de professores e colegas extremamente competentes, que fizeram parte da execução deste trabalho, sem eles esse trabalho não seria realizado como foi, posso citar os professores Dr. Caio Abércio da Silva, Dr. Ulisses de Pádua Pereira e Dr. Selwyn Arlington Headley junto com suas equipes, e as colegas de pós-graduação, Flavia Helena Pereira Silva e Ana Aparecida Correa Xavier.

Por fim, ao meu noivo, Lucas, por ter-se feito presente em cada etapa dos últimos 11 anos, com muita paciência e amor.

YASUMITSU, Carolina Yuka. **Deteção e quantificação de RNA de astrovírus suíno 3 em sistema nervoso central de suínos com polioencefalomielite no Brasil**. 2025. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

Astrovírus suíno 3 (PAstV3) é um vírus emergente na suinocultura mundial responsável por causar polioencefalomielite e sinais clínicos neurológicos em suínos. O objetivo deste estudo foi relatar a identificação de RNA de PAstV3 no sistema nervoso central (SNC) de suínos desmamados, provenientes de um rebanho do estado de São Paulo, sudeste do Brasil, apresentando tetraplegia, opistótono, nistagmo e febre ocasional, compatíveis com doença neurológica associada à polioencefalomielite. Fragmentos em duplicata de SNC de três animais com 24 a 26 dias de idade foram submetidos a avaliação histopatológica pela técnica de hematoxilina e eosina. As amostras de SNC foram também avaliadas por cultura bacteriana e técnicas moleculares (PCR e suas variações) para identificar os principais agentes de doenças infecciosas associados à doença neurológica em suínos (teschovírus suíno, sapelovírus suíno, enterovírus G suíno, pestivírus suíno atípico, senecavírus A, vírus da encefalomiocardite e PAstV3). As principais alterações neuropatológicas ocorreram na substância cinzenta da medula espinhal e tronco encefálico, sendo semelhantes em intensidade e distribuição e apresentando rombencefalite aguda, moderada, multifocal a coalescente, não supurativa e polioencefalomielite. Na cultura bacteriana nenhuma bactéria foi isolada. O RNA do PAstV3 foi detectado por *nested*-PCR, confirmado por sequenciamento de nucleotídeos (Sanger) e quantificado por RT-qPCR (Cq 24,55 a 32,51) nas amostras de SNC dos três suínos com evidência histopatológica de polioencefalomielite. Outros vírus já descritos em infecções no SNC de suínos não foram detectados pelas técnicas moleculares utilizadas. Esta é a primeira confirmação molecular de PAstV3 em suínos com doença neurológica e lesões consistentes com polioencefalomielite no Brasil e destaca a importância do monitoramento de eventos de saúde animal como a emergência de novos agentes etiológicos, que podem comprometer a produtividade da suinocultura e o bem-estar animal.

Palavras-chave: PAstV3. *Mamastrovirus*. Doença neurológica. Vírus neurotrópico.

YASUMITSU, Carolina Yuka. **Detection and quantification of swine astrovirus 3 RNA in the central nervous system of pigs with polioencephalomyelitis in Brazil.** 2025. 74pp. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Porcine astrovirus 3 (PAstV3) is an emerging virus in the global swine industry responsible for causing polioencephalomyelitis and neurological clinical signs in pigs. The aim of this study was to report the identification of PAstV3 RNA in the central nervous system (CNS) of weaned pigs from a herd in the state of São Paulo, southeastern Brazil, presenting tetraplegia, opisthotonus, nystagmus and occasional fever, consistent with neurological disease associated with polioencephalomyelitis. Duplicate CNS fragments from three animals aged 24 to 26 days were submitted to histopathological evaluation using the hematoxylin and eosin technique. CNS samples were also evaluated by bacterial culture and molecular techniques (PCR and variations) to identify the main infectious disease agents associated with neurological disease in pigs (Porcine teschovirus, porcine sapelovirus, porcine enterovirus G, atypical porcine pestivirus, senecavirus A, encephalomyocarditis virus and PAstV3). The main neuropathological alterations occurred in the gray matter of the spinal cord and brainstem, being similar in intensity and distribution and presenting acute, moderate, multifocal to coalescent, non-suppurative rhombencephalitis and polioencephalomyelitis. No bacteria were isolated in the bacterial culture. PAstV3 RNA was detected by nested-PCR, confirmed by nucleotide sequencing (Sanger) and quantified by RT-qPCR (Cq 24.55 to 32.51) in CNS samples from the three pigs with histopathological evidence of polioencephalomyelitis. Other viruses previously described in CNS infections in pigs were not detected by the molecular techniques used. This is the first molecular confirmation of PAstV3 in pigs with neurological disease and lesions consistent with polioencephalomyelitis in Brazil and highlights the importance of monitoring animal health events such as the emergence of new pathogens, which can compromise swine productivity and animal welfare.

Key-words: PAstV3. *Mamastrovirus*. Neurological disease. Neurotropic virus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AstV	<i>Astrovirus</i> (Astrovírus)
APPeV	<i>Atypical porcine pestivirus</i> (Pestivírus suíno atípico)
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNS	<i>Central Nervous System</i> (Sistema Nervoso Central)
DEPC	Dietil pirocarbonato
ED	<i>Edema disease</i> (Doença do edema)
EDEC	<i>Edema disease associated with Escherichia coli</i> (Doença do edema associada à <i>Escherichia coli</i>)
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i> (Vírus da encefalomiocardite)
ESK	<i>Embryonic Swine Kidney</i>
EV-G	<i>Enterovirus G</i> (Enterovírus suíno G)
H&E	<i>Hematoxylin e eosin</i> (Hematoxilina e eosina)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
Kb	Quilobases
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
Nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
ORF	<i>Open reading frame</i> (Sequência aberta de leitura)
PAstV	<i>Porcine astrovirus</i> (Astrovírus suíno)
PAstV1	<i>Porcine astrovirus 1</i> (Astrovírus suíno 1)
PAstV2	<i>Porcine astrovirus 2</i> (Astrovírus suíno 2)
PAstV3	<i>Porcine astrovirus 3</i> (Astrovírus suíno 3)
PAstV4	<i>Porcine astrovirus 4</i> (Astrovírus suíno 4)
PAstV5	<i>Porcine astrovirus 5</i> (Astrovírus suíno 5)
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão salina fosfato)
PCV-2	<i>Porcine circovirus 2</i> (Circovírus suíno 2)
PSV	<i>Porcine sapelovirus</i> (Sapelovírus suíno)
PTV	<i>Porcine teschovirus</i> (Teschovírus suíno)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)

	quantitativa)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase)
RT-qPCR	RT-PCR quantitativa
SNC	Sistema Nervoso Central
Stx2e	<i>Shiga-Like Toxin 2e</i> (Toxina <i>Shiga-like 2e</i>)
SVA	Senecavirus A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	13
2.1	Doenças Neurológicas dos Suínos	13
2.2	Astrovírus	15
2.2.1	Astrovírus suíno	17
2.2.1.1	Astrovírus suíno 3 (PAstV3)	20
2.2.1.1.1	<i>Astrovírus suíno 3 (PAstV3) e doença neurológica</i>	20
3	REFERÊNCIAS	23
4	HIPÓTESE	37
5	OBJETIVOS	38
5.1	OBJETIVO GERAL	38
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6	ARTIGO - Porcine astrovirus 3 RNA in the central nervous system of weaned pigs with neurologic disease and polioencephalomyelitis in Brazil	39
7	CONCLUSÕES	47
8	PERSPECTIVAS	48
	ANEXOS	49
	ANEXO A – Lista de reagentes	50
	ANEXO B – Soluções e tampões	54
	ANEXO C – Protocolos e técnicas	60
	ANEXO D – Lista de softwares	71

1 1 INTRODUÇÃO

2 A suinocultura no Brasil, é um dos setores com maior impacto
3 socioeconômico na agropecuária, ocupando o quarto lugar nos *rankings* mundiais de
4 produção e de exportação de carne suína, com 1,23 milhão de toneladas exportadas
5 em 2023 (ABPA, 2024). No mesmo ano foram abatidos 46,5 milhões de suínos, com
6 valor de produção bruta de aproximadamente 34,1 bilhões de reais (ABPA, 2024).

7 O mercado interno brasileiro é a base da manutenção da suinocultura
8 no país e representa mais de 70% da produção nacional (ABPA, 2024). Com a alta
9 demanda por carne suína tanto no mercado nacional quanto internacional,
10 investimentos na intensificação e modernização dos sistemas de produção tornam-se
11 essenciais. Porém, em contrapartida, aumentam-se os riscos do surgimento de
12 doenças infectocontagiosas que impactam a rentabilidade do setor produtivo,
13 consequência de fatores como a alta densidade de animais (Alfieri, 2007).

14 Os suínos são susceptíveis a uma série de infecções que podem
15 afetar o sistema nervoso central (SNC). Os vírus neurotrópicos podem representar um
16 problema de saúde importante em animais e também em humanos com a
17 possibilidade de transmissão entre as espécies, infecções em suínos podem ter
18 impacto também em saúde pública (Granerod *et al.* 2010; De Blauw *et al.* 2020; Wildi
19 e Seuberlich, 2021). Os vírus com potencial neurotrópico podem representar um
20 importante desafio sanitário com impacto econômico para a cadeia produtiva de
21 suínos. A vigilância ativa, avanços no diagnóstico e a implementação de medidas de
22 biosseguridade interna e externa são fundamentais para mitigar riscos de infecções e
23 os seus potenciais efeitos deletérios à produção e produtividade desta cadeia
24 produtiva. Logo, o estudo da interação entre os vírus neurotrópicos e o sistema
25 imunológico dos suínos pode abrir caminhos para o desenvolvimento de vacinas e
26 terapias eficazes.

27 Astrovírus (AstV) já foram detectados em mamíferos e em aves. A
28 primeira descrição de AstV associado a infecção com doença neurológica em
29 humanos ocorreu nos Estados Unidos da América (EUA), no ano de 2010 (Quan *et al.*
30 2010). Já a primeira descrição de astrovírus suíno 3 (PAstV3) em SNC de suínos
31 com sinais clínicos neurológicos ocorreu na Europa em 2017 (Bóros *et al.* 2017).
32 Como PAstV3 é um vírus amplamente adaptado a hospedeiros vertebrados, as

1 recentes identificações deste vírus em SNC de suínos criaram preocupação com os
2 riscos de sua disseminação em escala epidêmica (Chen *et al.* 2020; Wildi e
3 Seuberlich, 202

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM SUÍNOS

As doenças que afetam o SNC de suínos são relativamente frequentes em diversas fases da produção (Madson *et al.* 2019). Essas doenças podem ser causadas por fatores genéticos, congênitos e/ou tóxicos (Donin *et al.* 2015; Madson *et al.* 2019), embora a maioria ainda seja de origem infecciosa, incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos (Aragon, Segalés e Tucker, 2019; Madson *et al.* 2019).

Entre os agentes bacterianos mais frequentes em infecções neurológicas em suínos estão *Streptococcus suis* (*S. suis*), *Glaesserella parasuis* (*G. parasuis*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Infecções por esses agentes ocorrem predominantemente em leitões lactentes e no período do pós-desmame (Hammerschmitt, 2021).

S. suis é o agente causador de meningite estreptocócica em suínos. A infecção ocorre com maior incidência em suínos com 5 a 10 semanas de idade. Os sinais clínicos observados são incoordenação motora, movimentos de pedalagem, decúbito lateral, opistótono e crises convulsivas (Gottschalk e Segura, 2019; Santos e Barcelos, 2012; Madson *et al.* 2019). No Brasil, *S. suis* é um agente etiológico enzoótico sendo que o sorotipo 2 o mais prevalente. Porém, outros sorotipos já foram isolados de amostras biológicas de suínos com sinais clínicos (Soares *et al.* 2014; Matajira *et al.* 2020; Hammerschmitt *et al.* 2022).

A doença de Glässer, causada pela bactéria *G. parasuis* (Espíndola *et al.* 2019; Dickerman, Bandara e Inzana, 2020), é uma infecção septicêmica envolvida em quadros de pneumonia, polisserosite fibrinosa, poliartrite e meningite, acometendo leitões do período do desmame até a terminação. A doença aguda, caracteriza-se por sinais clínicos como hipertermia, tumefação articular com claudicação, movimentos de pedalagem e tremor generalizado (Santos, Sobestiansky e Santos, 2012; Espíndola *et al.* 2019; Aragon, Segalés e Tucker, 2019). Em leitões, surtos da doença de Glässer podem ocasionar taxas de mortalidade de 5 a 10% do plantel (Costa-Hurtado *et al.* 2020). Os sorotipos 1, 4 e 5 são os mais relevantes no Brasil, representando 70% dos isolados (Espíndola *et al.* 2019). No Brasil, há relatos

da ocorrência de doença de Glässer em rebanhos das principais regiões produtoras de suínos (Moreno *et al.* 2011; Teixeira, Kuchiishi e Brandelli, 2011; Espíndola *et al.* 2019; Bom *et al.* 2020).

A doença do edema, também envolvida em quadros clínicos neurológicos em suínos, é causada pela bactéria *Escherichia coli* (EDEC - *Escherichia coli* associada à doença do edema). A infecção pode ocasionar lesões intestinais, subcutâneas e tronco encefálicas. Essas lesões são causadas pela toxina *Shiga-Like Toxin 2e* (Stx2e). Leitões desmamados apresentam manifestação sistêmica com a ocorrência de edemas e de sinais clínicos neurológicos como andar em círculos, opistótono e ataxia progressiva (Fairbrother e Nadeau, 2019).

As encefalites causadas por infecções virais possuem relevância mundial (De Blauw *et al.* 2020; Wildi e Seuberlich, 2021). Entre os potenciais patógenos virais que com frequência são associados ao desenvolvimento de doenças neurológicas em suínos destacam-se teschovírus suíno (*Porcine teschovirus* - PTV), sapelovírus suíno (*Porcine sapelovirus* - PSV) (Donin *et al.* 2014), pestivírus suíno atípico (*Atypical porcine pestivirus* - APPeV) (Possatti *et al.* 2018) e astrovírus suíno 3 (*Porcine astrovirus 3* - PAstV3) (Yasumitsu *et al.* 2024). Outros vírus como enterovírus G suíno (Donin *et al.* 2014), Senecavírus A (Leme *et al.* 2015), e o vírus da encefalomiocardite (*Encephalomyocarditis virus*) (Gris *et al.* 2023) também já foram associados a doença neurológica em suínos no Brasil.

PTV inclui 13 diferentes sorotipos que ocasionam doenças subclínicas e/ou infecções assintomáticas em suínos. Entretanto, algumas cepas com maior potencial de virulência podem levar a quadros de polioencefalomielite grave que, anteriormente, eram denominados como doença de Teschen (Trefny, 1930). A doença é mais frequente em suínos de idade entre seis e sete semanas (SHIC, 2021). Os animais acometidos podem apresentar sinais clínicos como hipertermia, incoordenação motora, nistagmo e convulsões. Nesta faixa etária a taxa de mortalidade pode alcançar até 90% (Yamada *et al.* 2008; Salles *et al.* 2011; Horak, Killoran e Larson, 2016; Alexandersen *et al.* 2019).

As infecções por PSV ocorrem predominantemente em animais com idade entre 40 e 65 dias (Hammerschmitt *et al.* 2021). Com frequência, as infecções são assintomáticas. Porém, animais infectados podem apresentar sinais clínicos de polioencefalomielite, além de sinais respiratórios e entéricos. Em matrizes a infecção

pode ser acompanhada por distúrbios reprodutivos (Horak, Killoran e Larson, 2016; Arruda *et al.* 2017; Kumari *et al.* 2019).

APPeV é um vírus causador de tremor congênito em leitões recém-nascidos que foi descrito pela primeira vez em 2015 nos EUA (Hause *et al.* 2015). Posteriormente, o vírus foi identificado em leitões com sinais clínicos neurológicos provenientes de diversos continentes, incluindo rebanhos sul-americanos no Brasil (Postel *et al.* 2016; Williamson e Group, 2017; Muñoz-González *et al.* 2017; Kim *et al.* 2017; Possatti *et al.* 2018; Gatto *et al.* 2018; Dénes *et al.* 2018).

A variedade de agentes causadores de infecções neurológicas em suínos com sinais clínicos muito semelhantes torna a realização de um diagnóstico clínico extremamente difícil. Portanto, considerando os agentes infecciosos mencionados anteriormente como relevantes na suinocultura, bem como a emergência de novos microrganismos, a exemplo de PAsTV3, é imprescindível que os gestores sanitários dos rebanhos suínos tenham conhecimento sobre as particularidades de cada doença, tenham condições de providenciar a realização de diagnóstico etiológico e tenham condições de implementar e avaliar estratégias de mitigação de risco sanitário e de controle e profilaxia das infecções (Wildi e Seuberlich, 2021; Obradovic *et al.* 2021).

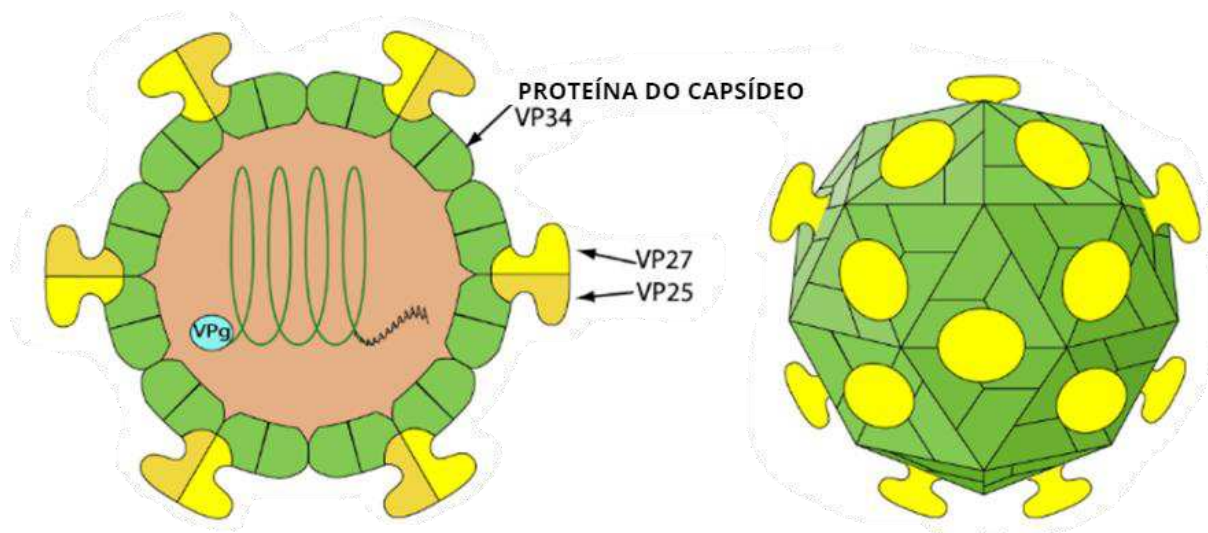
2.2 ASTROVÍRUS

As partículas virais da família *Astroviridae* possuem morfologia icosaédrica, com diâmetro de 28-35 nm e não possuem envelope (Figura 1). O genoma é composto por uma fita simples linear de RNA com polaridade positiva, com tamanho variando entre 6,4–7,7 kb (ICTV, 2024) (Lulla e Firfh, 2020). O genoma são identificadasapresenta três sequências abertas de leitura - ORFs (*Open Reading Frame*) e duas regiões não traduzidas (UTR's – *Untranslated regions*). As ORF1a e ORF1b codificam proteínas não estruturais (*Non structural protein* - NSP).

A partir do RNA subgenômico (sgRNA) a ORF2 codifica uma proteína de capsídeo (Cap) (Donato e Vijaykrishna, 2017), e uma poliproteína proteína precursora com tamanho molecular total (VP90) do capsídeo que sofre diversas clivagens por proteases celulares (caspases), gerando uma proteína denominada VP70, que é novamente clivada por proteases gerando três polipeptídeos (VP25,

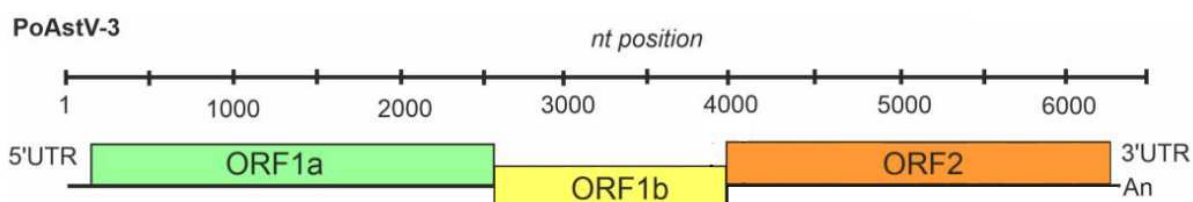
VP27 e VP34). As proteínas VP25 e VP27 formam as espículas de superfície e são sítios de ligação dos anticorpos neutralizantes enquanto a VP34 forma o capsídeo (Payne, 2017).

Figura 1 – Esquema da Partícula viral de Astrovírus. Imagem de ViralZone, sob uma Licença Internacional *Creative Commons Attribution 4.0*.



Fonte: Adaptada ICTV, 2024.

Figura 2 – Alinhamento da sequência de nucleotídeos da junção parcial ORF1b-ORF2 de astrovírus suínos tipo 3 (PAstV3) disponíveis publicamente.



Fonte: László *et al.* 2022.

A família *Astroviridae* é dividida em dois gêneros. O gênero, *Avastrovirus* (AAstV) compreende três espécies virais encontradas em aves (Donato e Vijaykrishna, 2017) e o gênero *Mamastrovirus* (MAstV) que, até o momento, compreende 19 espécies virais de origem mamífera (ICTV, 2024). Essa classificação é baseada nas sequências completas de aminoácidos da ORF2, com similaridade mínima de 75% entre cepas da mesma espécie (King *et al.* 2011; Huang *et al.* 2024). Entretanto, como o número de sequências disponíveis é limitado, ainda não foi

possível classificar muitas cepas de AstV (Donato e Vijaykrishna, 2017; Wang *et al.* 2021; Huang *et al.* 2024).

Os vírus dessa família já foram detectados em mais de 80 espécies animais incluindo humanos, mamíferos e aves (Mendenhall, Smith e Vijaykrishna, 2015). MAstV estão relacionados predominantemente a infecção de mamíferos (Pankovics *et al.* 2015; Ng *et al.* 2024), apesar de diversos estudos descreverem infecções por MAstV em aves e por AAstV em mamíferos (Sun *et al.* 2014; Meyer *et al.* 2015; Pankovics *et al.* 2015). A infecção entre espécies virais e animais/humanos, destaca a natureza adaptativa dos vírus dessa família e o potencial risco zoonótico das infecções por AstV's (Wohlgemuth, Honce e Schultz-Cherry, 2019; Huang *et al.* 2024).

A primeira descrição de AstV foi realizada em fezes humanas foi em 1975 (Appleton e Higgins, 1975; Madeley e Cosgrove, 1975). Infecções assintomáticas e sintomáticas já foram descritas, porém doença clínica ocorre com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos (Johnson *et al.* 2017). A infecção por AstV em crianças, tem como consequência a ocorrência de gastroenterite, sendo precedida em importância clínica e epidemiológica somente pela infecção por rotavírus (Maclachlan *et al.* 2016).

Em 2010, nos EUA, AstV foi descrito pela primeira vez em associação a um quadro neurológico em humanos (Quan *et al.* 2010). Este achado ressalta a possibilidade de infecções extraintestinais causadas por este vírus, o que posteriormente foi reiterado por um número considerável de descrições de AstV relacionados a encefalites em humanos em países como o Reino Unido (Brown *et al.* 2015; Lum *et al.* 2016; Bami *et al.* 2022), França (Frémond *et al.* 2015), Japão (Sato *et al.* 2016), Suíça (Wunderli *et al.* 2011; Cordey *et al.* 2016), Alemanha (Koukou *et al.* 2019) e Suécia (Król *et al.* 2021).

2.2.1 Astrovírus suíno

Astrovírus suínos (PAstV) são classificados na família *Astroviridae*, gênero *Mamastrovirus* e espécie *Mamastrovirus suis* e estão subdivididos em cinco linhagens distintas (PAstV-1 a 5) (Bóros *et al.* 2017; ICTV 2024), sendo possível a ocorrência de infecções sintomáticas ou assintomáticas.

As cinco linhagens de PAsTV são filogeneticamente distantes entre si estando mais relacionados a AsTV de espécies aviárias do que entre as linhagens da própria espécie (Luo *et al.* 2011). Essa diversidade pode indicar um precursor diferente para cada linhagem viral (Haley *et al.* 2024). Há ainda a possibilidade de infecções por múltiplas linhagens de PAsTV em um mesmo animal (Luo *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2013) que é um fator de risco importante para a ocorrência de eventos de recombinação genômica.

As primeiras descrições de PAsTV foram relacionadas à manifestação entérica em suíno apresentando diarreia em 1980 (Bridger, 1980). Dez anos após à primeira descrição em suínos o vírus foi isolado em cultivo celular ESK (*Embryonic Swine Kidney*) no Japão (Shimizu *et al.* 1990) e em 2001 foi realizada a primeira descrição molecular de PAsTV em fezes, que foi denominado PAsTV1 (Jonassen *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Laurin, Dastor e L'Homme, 2011; Shan *et al.* 2012). Até o momento, há descrição de outras quatro linhagens de PAsTV (PAsTV2-5) (Laurin, Dastor e L'Homme, 2011; Luo *et al.* 2011; Shan *et al.* 2012).

PAsTV são associados a quadros entéricos (Xiao *et al.* 2013; Salamunova *et al.* 2018), e todas as linhagens já foram descritas associadas a quadros de diarreia, com maior concentração de descrições na Ásia, incluindo a China (Lan *et al.* 2011; He *et al.* 2024), Japão (Ito *et al.* 2017); Coreia do Sul (Lee *et al.* 2013; Shin *et al.* 2021), Tailândia (Kumthip *et al.* 2018) e Índia (Kattoor *et al.* 2019; Sawant *et al.* 2023).

Existem descrições de quadros entéricos em suínos distribuídos por todo o continente europeu, incluindo Hungria (Reuter, Pankovics e Bóros, 2011; Zhou *et al.* 2015), Alemanha (Kreuzer *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2015), Croácia (Brnić *et al.* 2013; Brnić *et al.* 2014), Itália (Monini *et al.* 2015; Tassoni *et al.* 2019), Austria (Zhou *et al.* 2015), Espanha (Zhou *et al.* 2015; Puente *et al.* 2023), Suécia (Zhou *et al.* 2015), Dinamarca (Goecke *et al.* 2017), Eslováquia (Salamunova *et al.* 2018; Vilcek, Salamunova e Jackova, 2019), Bélgica (Van Borm *et al.* 2020), República Tcheca (Indik *et al.* 2006), França (Capai *et al.* 2022) e Grécia (Stamelou *et al.* 2022).

Na América do Norte, há descrições do vírus em suínos, no Canadá (Luo *et al.* 2011; Nantel-Fortier *et al.* 2022) e nos EUA (Mor *et al.* 2012; Xiao *et al.* 2013; Opriessnig, Xiao e Halbur, 2020), enquanto na América do Sul três países incluindo Colômbia (Ulloa e Gutiérrez, 2010), Chile (Flores *et al.* 2021) e Brasil

(Hammerschmitt *et al.* 2021) já relataram a presença de PAsV. PAsV também já foi detectado no continente africano, África do Sul (Amimo *et al.* 2020) e na Oceania, Austrália (Bhatta, Chamings e Alexandersen, 2021).

Apesar das infecções por PAsV serem relacionadas a quadros clínicos entéricos, algumas descrições do vírus foram relatadas em animais assintomáticos como em grupos de animais utilizados como controle em pesquisas realizadas na Alemanha (Kreuzer *et al.* 2012) e no Brasil em 2021 (Hammerschmitt *et al.* 2021).

Quadros clínicos não entéricos já foram descritos na Hungria ocasionado por PAsV3 (László *et al.* 2022) e por PAsV4 nos EUA (Padmanabhan e Hause, 2016; Rahe *et al.* 2023). Em 2016 nos EUA, PAsV4 foi descrito em suínos com 10-21 dias de idade apresentando doença respiratória. Porém, nesta situação não foi possível estabelecer uma relação direta entre a detecção do vírus e o estabelecimento de sinais clínicos (Padmanabhan e Hause, 2016). Em 2023, nos EUA, PAsV4 foi identificado por hibridização *in situ* realizada em tecido do sistema respiratório de suínos com 42 dias de idade. O RNA do vírus foi detectado em lesões consistente com infecção viral no epitélio respiratório. Essa foi a primeira descrição da relação direta da infecção por PAsV4 com sinais clínicos respiratórios (Rahe *et al.* 2023).

Um estudo realizado na Suécia, em 2012, detectou PAsV2 e 5 em tecido cerebral de leitões com idade entre quatro e seis dias apresentando tremor congênito. Entretanto, esse estudo não foi considerado a primeira descrição de encefalite causada por PAsV pois, concomitantemente, também foi detectado circovírus suíno tipo 2 (*Porcine circovirus 2* - PCV2) em amostras de animais do mesmo rebanho. Na ocasião, ambos os vírus (PAsV2 e 5 e PCV2) foram detectados tanto em animais com sinais clínicos neurológicos quanto em animais assintomáticos (Blomström, Ley e Jacobson, 2014).

No Brasil, a primeira descrição de PAsV foi realizada em um estudo que investigou a presença de PTV, PSV e PAsV em um surto de doença neurológica em granja localizada no Sul do Brasil (Hammerschmitt *et al.* 2021). No entanto, nesse estudo, a presença de PAsV foi encontrada em amostras fecais de animais assintomáticos que pertenciam ao grupo controle. Nesse estudo, o ensaio utilizado foi uma RT-PCR Pan-Astrovírus para amplificação do gene RdRp (Chu *et al.* 2008), não

1 determinando a linhagem de PAsV.

2 Sinais neurológicos em suínos foram relatadas e atribuídas pela
3 primeira vez ao PAsV3 na Hungria (Bóros *et al.* 2017), seguidas por relatos nos
4 Estados Unidos em 2017 (Arruda *et al.* 2017), na Coreia do Sul em 2020 (Park *et al.*
5 2024) e no Brasil em 2023 (Yasumitsu *et al.* 2024).

6 A primeira confirmação molecular de PAsV associado a doença
7 clínica no Brasil, ocorreu em 2023, em que PAsV3 foi identificado e associado a
8 polioencefalomielite em leitões com idades entre 24 e 26 dias (Yasumitsu *et al.* 2024).
9 Inicialmente, foi realizada a triagem com amplificação do gene RdRp (Chu *et al.* 2008)
10 e em seguida, foi confirmado por RT-qPCR (Cap) específica para PAsV3 (Rawal *et*
11 *al.* 2019).

12 Não há outros estudos acerca PAsV no Brasil além destes dois
13 publicados, ratificando a importância da realização de estudos complementares sobre
14 a presença deste vírus emergente no país.

15 2.2.1.1 Astrovírus suíno 3

16 A primeira descrição de PAsV3 foi em amostras de fezes de suínos
17 coletadas entre 2005 e 2007 no Canadá (Luo *et al.* 2011). O primeiro depósito de
18 genoma completo de PAsV3 foi realizado em 2012, descrevendo a cepa como uma
19 linhagem distinta das demais (Xiao, Halbur e Opriessnig, 2012; ICTV 2024).

20 Estudos adicionais relataram a presença de PAsV3 em amostras
21 fecais normais e diarreicas em países do continente americano, europeu, asiático e
22 africano (Rawal *et al.* 2019; Amimo *et al.* 2020; Folgueiras-González *et al.* 2021; Liu
23 *et al.* 2021; Nantel-Fortier *et al.* 2022).

24 Na Hungria, além de amostras fecais o vírus também foi descrito em
25 *swabs* nasais de leitões com doença neurológica (Bóros *et al.* 2017) e em leitões
26 assintomáticos (László *et al.* 2022). Nos EUA, PAsV3 também foi identificado em
27 *swabs* orofaríngeos de animais provenientes rebanhos com circulação de PAsV3
28 previamente conhecida (Rawal *et al.* 2020).

29 2.2.1.1.1 Astrovírus suíno 3 e doença neurológica

30 Relatos que correlacionaram a ocorrência de sinais clínicos

neuroológicos com a infecção por PAstV3 são relativamente recentes. A primeira descrição ocorreu na Hungria em 2017 em leitões com paraplegia posterior. Essa descoberta baseou-se em amostras de SNC coletadas entre 2015 e 2016, em leitões com idade entre 25 e 35 dias (Bóros *et al.* 2017). Neste relato, PAstV3 foi identificado em cérebro, tronco cerebral e medula espinhal de animais com sinais clínicos, que apresentavam lesões consistentes com encefalomielite e necrose neural. Ainda em 2017, nos EUA, por meio do sequenciamento de nova geração (*New generation sequencing* – NGS), PAstV3 foi o único patógeno identificado em SNC de duas fêmeas adultas e de um leitão de 35 dias de idade. Os sinais clínicos apresentados eram fraqueza dos membros posteriores, tetraplegia e convulsões. A histopatologia foi sugestiva de polioencefalomielite não supurativa infecciosa (Arruda *et al.* 2017).

Posteriormente, em 2020, na Coréia do Sul, PAstV3 foi descrito em leitões com idades entre quatro e oito semanas associado a encefalomielite não supurativa, vacuolização neuronal e gliose. Entretanto, PAstV5 foi identificado em infecção singular, infecções mistas de PAstV1, 4, e 5, e PAstV3 e 5, sugerindo que, além de PAstV3, possivelmente as outras linhagens de PAstV estavam associadas. Adicionalmente, essas linhagens podem também apresentar comportamento neurotrópico, embora estudos complementares sejam necessários para confirmar esse comportamento (Park *et al.* 2024).

Com o objetivo de avaliar a patogenia, sinais clínicos e alterações histopatológicas da infecção pelo PAstV3 em suínos em um ambiente controlado, em 2021, foi realizado um estudo de infecção experimental em suínos (Ferreira *et al.* 2021). Apesar de alguns estudos falharem no isolamento viral (Indik *et al.* 2006; Fang *et al.* 2019), leitões de seis semanas de idade foram inoculados com homogeneizados de SNC obtidos de surtos de doença neurológica positivos para PAstV3 e negativos para os demais patógenos causadores de doença neurológica. Após 25 dias de infecção (dpi), todos os animais se apresentavam clinicamente letárgicos, e aos 28 dpi apresentaram ataxia dos membros posteriores e foram submetidos a eutanásia. A presença de PAstV3 no SNC foi confirmada por RT-qPCR, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica. Adicionalmente, altos títulos de anticorpos foram encontrados a partir do dia 14 dpi. Histologicamente, todos os animais inoculados apresentaram lesões compatíveis com polioencefalomielite linfoplasmocítica contendo áreas multifocais de gliose e manguitos perivasculares. Portanto, esse foi o primeiro estudo

1 que reproduziu a doença no SNC ocasionada pelo PAstV3 com sinais clínicos que
2 mimetizam a infecção natural (Ferreyra *et al.* 2021).

3 O desenvolvimento de métodos de controle para PAstV3 é
4 imprescindível, considerando sua capacidade de infectar diversos tecidos (Rawal *et*
5 *al.* 2019; László *et al.* 2022) e a sua emergência em infecções do SNC. Também são
6 necessários estudos adicionais que visem elucidar a patogenia e disseminação de
7 PAstV3 (Matias Ferreyra *et al.* 2021).

8 Em 2021, Matias Ferreyra e colaboradores, identificaram dois
9 epítomos antigênicos conservados correspondentes as extremidades 3' da VP27 em
10 cepas virais norte americanas. Este achado abre a perspectiva do desenvolvimento
11 de vacinas específicas para PAstV3 com o objetivo de prevenir surtos associados a
12 cepas neurotrópicas (Matias Ferreyra *et al.* 2021).

13 Até o momento, não existe confirmação molecular do PAstV3 no
14 Brasil, e com o número de detecções crescente ao redor do mundo, a investigação da
15 presença do vírus em casos com sinais clínicos compatíveis é essencial.

3 REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2024. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>. Acesso em: setembro 2024.

ALEXANDERSEN, S.; KNOWLES, N.; DEKKER, A.; BELSHAM, G.; ZHIDONG, Z.; KOENEN, F. Picornaviruses. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. **Diseases of Swine**. 11. ed. Wiley-Blackwell, 2019. cap 40, p. 668-675.

ALFIERI, A.A. Desafios sanitários para o mercado mundial da carne. A zootecnia frente aos novos desafios, **UEL Editora**, Brasil, p.315-316, 2007.

AMIMO, J.O.; MACHUKA, E.M.; ABWORO, E.O.; VLASOVA, A.N.; PELLE, R. Whole genome sequence analysis of porcine astroviruses reveals novel genetically diverse strains circulating in east african smallholder pig farms. **Viruses**, v.12, n.11, p.1262, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12111262>

APPLETON, H.; HIGGINS, P.G. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. **Lancet**, v.1, n.7919, p.1297, 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)92581-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)92581-7)

ARAGON, V.; SEGALÉS, J.; TUCKER, A.W. Glasser's Disease. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. **Diseases of Swine**. 11. ed. Wiley-Blackwell, 2019. cap 54, p. 844-851.

ARRUDA, B.; ARRUDA, P.; HENSCH, M.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; YANG, C.; GATTO, I.R.H.; FERREYRA, F.M.; GAUGER, P.; SCHWARTZ, K.; BRADNER, L.; HARMON, K.; HAUSE, B.; LI, G. Porcine astrovirus type 3 in central nervous system of swine with polioencephalomyelitis. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.12, p.2097-2100, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.170703>

BAMI, S.; HIDINGER, J.; MADNI, A.; HARGEST, V.; SCHULTZ-CHERRY, S.; CORTEZ, V.; CROSS, S.J.; WARD, D.A.; HAYDEN, R.T.; RUBNITZ, J.; PUI, C.H.; KHAN, R.B.; HIJANO, D.R. Human astrovirus VA1 encephalitis in pediatric patients with cancer: report of 2 cases and review of the literature. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v.11, n.9, p.408-412, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/piac045>

BHATTA, T.R.; CHAMINGS, A.; ALEXANDERSEN, S. Exploring the cause of diarrhoea and poor growth in 8-11-week-old pigs from an australian pig herd using metagenomic sequencing. **Viruses**, v.13, n.8, p.1608, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13081608>

BLOMSTRÖM, A.L.; LEY, C.; JACOBSON, M. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type II in piglets? **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.56, n.1, p.82, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0082-y>

BOM, H.A.S.C.; SILVA FILHO, G.B.; SILVA, E.G.; PEREIRA, M.R.; FONSECA, S.M.C.; BOSWELL, R.; ALMEIDA, V.M.; SOUZA, F.A.L.; MENDONÇA, F.S. Doença de Glässer em suínos no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.40, n.9, p.662-668, 2020.

BÓROS, A.; ALBERT, M.; PANKOVICS, P.; BÍRÓ, H.; PESAVENTO, P.A.; PHAN, T.G. DELWART, E.; REUTER, G. Outbreaks of neuroinvasive astrovirus associated with encephalomyelitis, weakness, and paralysis among weaned pigs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n. 12, p.1982-1993, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.170804>

BRIDGER, J.C. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. **Veterinary Record**, v.107, n.23, p.532-533, 1980.

BRNIĆ, D.; JEMERŠIĆ, L.; KEROS, T.; PRPIĆ, J. High prevalence and genetic heterogeneity of porcine astroviruses in domestic pigs. **Veterinary Journal**, v.202, n.2, p.390–392, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.015>

BRNIĆ, D.; PRPIĆ, J.; KEROS, T.; ROIĆ, B.; STAREŠINA, V.; JEMERŠIĆ, L. Porcine astrovirus viremia and high genetic variability in pigs on large holdings in Croatia. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p.258–264, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.027>

BROWN, J.R.; MORFOPOULOU, S.; HUBB, J.; EMMETT, W.A.; IP, W.; SHAH, D.; BROOKS, T.; PAINE, S.M.; ANDERSON, G.; VIRASAMI, A.; TONG, C.Y.; CLARK, D.A.; PLAGNOL, V.; JAKUES, T.S.; QASIM, W.; HUBANK, M.; BREUER, J. Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.60, n.6, p.881-888, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciu940>

CAPAI, L.; PIORKOWSKI, G.; MAESTRINI, O.; CASABIANCA, F.; MASSE, S.; DE LAMBALLERIE, X.; CHARREL, R.N.; FALCHI, A. Detection of porcine enteric viruses (Kobuvirus, Mamastrovirus and Sapelovirus) in domestic pigs in Corsica, France. **PLoS One**, v. 17, n.1, p.e0260161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260161>

CHEN, Q.; XU, X.; YU, Z.; SUI, C.; ZUO, K.; ZHI, G.; JI, J.; YAO, L.; KAN, Y.; BI, Y.; XIE, Q. Characterization and genomic analysis of emerging astroviruses causing fatal gout in goslings. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.67, n.2, p.865–876, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13410>

CHU, D.K.W.; POON, L.L.M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J.S.M. Novel astroviruses in insectivorous bats. **Journal of Virology**, v.82, n.18, p.9107-9114, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00857-08>

CORDEY, S.; VU, D.L.; SCHIBLER, M.; L'HUILLIER, A.G.; BRITO, F.; DOCQUIER, M.; POSFAY-BARBE, K.M.; PETTY, T.J.; TURIN, L.; ZDOBNOV, E.M.; KAISER, L. Astrovirus MLB2, a new gastroenteric virus associated with meningitis and disseminated infection, **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.5, p.846-853, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2205.151807>

COSTA-HURTADO, M.; BARBA-VIDAL, E.; MALDONADO, J.; ARAGON, V. Update on Glässer's disease: how to control the disease under restrictive use of antimicrobials. **Veterinary Microbiology**, v.242, p.108595, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108595>

DE BLAUW, D.; BRUNING, A.H L.; BUSCH, C.B.E.; KOLODZIEJ, L.M.; JANSEN, N.J.G.; VAN WOENSEL, J.B M.; PAJKRT, D. Dutch pediatric encephalitis study group - Epidemiology and etiology of severe childhood encephalitis in the Netherlands. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.39, n.4, p.267-272, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002551>

DÉNES, L.; BIKSI, I.; ALBERT, M.; SZEREDI, L.; KNAPP, D.G.; SZILASI, A.; BÁLINT, Á.; BALKÁ, G. Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, n.6, p.2039-2042, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12981>

DICKERMAN, A.; BANDARA, A.B.; INZANA, T.J. Phylogenomic analysis of *Haemophilus parasuis* and proposed reclassification to *Glaesserella parasuis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 180-186, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003730>

DONATO, C.; VIJAYKRISHNA, D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. **Viruses**, v.9, n.5, p. 102, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9050102>

DONIN, D.G.; LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALBERTON, G.C.; ALFIERI, A.A. First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, n.3, p. 523-528, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z>

DONIN, D.G.; LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALBERTON, G.C.; ALFIERI, A.A. Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 05, p. 403-408, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000500003>

ESPÍNDOLA, J.P.; BALBINOTT, N.; GRESSLER, L.T.; MACHADO, G.; KLEIN, C.S.; REBELATTO, R.; MARTÍN, C.B.G.; KREUTZ, L.C.; SCHRYVERS, A.B.; FRANDOLOSO, R. Molecular serotyping of clinical strains of *Haemophilus* (*Glaesserella*) *parasuis* brings new insights regarding Glässer's disease outbreaks in Brazil. **PeerJ**, v. 7, p. 6817, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.6817>

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E. Colibacillosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. **Diseases of Swine**. 11. ed. Wiley-Blackwell, 2019. cap 52, p. 817-826.

FANG, Q.; WANG, C.; LIU, H.; WU, Q.; LIANG, S.; CEN, M.; DONG, Q.; WEI, Y.; CHEN, Y.; OUYANG, K.; WEI, Z.; HUANG, W. Pathogenic characteristics of a porcine astrovirus strain isolated in China. **Viruses**, v.11, n.12, p.1156, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11121156>

FERREYRA, F.M.; ARRUDA, P.E.H.; BRADNER, L.K.; HARMON, K.M.; ZHANG, M.; GIMÉNEZ-LIROLA, L.; ARRUDA, B.L. Experimental porcine astrovirus type 3-associated polioencephalomyelitis in swine. **Veterinary Pathology**, v.58, n.6, p.1064–1074. DOI: <https://doi.org/10.1177/03009858211025794>

FERRONATO, C.; LEME, R.A.; DINIZ, J.A.; DALL AGNOL, A.M.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis. **Tropical Animal Health and Production**, v.50, n.2, p. 337-344, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1436-z>

FLORES, C.; ARIYAMA, N.; BENNETT, B.; MENA, J.; VERDUGO, C.; MOR, S.; BRITO, B.; RAMÍREZ-TOLOZA, G.; NEIRA, V. Case report: first report and phylogenetic analysis of porcine astroviruses in Chile. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, p.764837, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.764837>

FOLGUEIRAS-GONZÁLEZ, A.; VAN DEN BRAAK, R.; DEIJS, M.; KULLER, W.; SIETSMA, S.; THURING, V.; VAN DER HOEK, L.; DE GROOF, A. Dynamics of the enteric virome in a swine herd affected by non-PCV2/PRRSV postweaning wasting syndrome. **Viruses**, v.13, n.12, p.2538, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13122538>

FRÉMOND, M.L.; PEROT, P.; MUTH, E.; CROS, G.; DUMAREST, M.; MAHLAOU, N.; SEIHEAN, D.; DESGUERRE, I.; HEBERT, C.; CORRE-CATELIN, N.; NEVEN, B.; LECUIT, M.; BLANCHE, S.; PICARD, C.; ELIOT, M. Next-generation sequencing for diagnosis and tailored therapy: a case report of astrovirus-associated progressive encephalitis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v.4, n.3, p. e53–e57, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/piv040>

GATTO, I.R. H.; ARRUDA, P.H.; VISEK, C.A.; VICTORIA, J.G.; PATTERSON, A.R.; KRULL, A.C.; SCHWARTZ, K.J.; DE OLIVEIRA, L.G.; ARRUDA, B.L. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, n.2, p.e339–e343, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12759>

GOECKE, N.B.; HJULSAGER, C.K.; KONGSTED, H.; BOYE, M.; RASMUSSEN, S.; GRANBERG, F.; FISCHER, T.K.; MIDGLEY, S.E.; RASMUSSEN, L.D.; ANGEN, Ø.; NIELSEN, J.P.; JORSAL, S.E.; LARSEN, L.E. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhoea syndrome in danish pigs. **BMC Veterinary Research**, v.13, n.1, p.315, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1239-5>

GOTTSCHALK, M; SEGURA, M. Streptococcosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. **Diseases of Swine**. 11 ed, Wiley-Blackwell, 2019. cap 61, p. 934-945.

GRANEROD, J.; TAM, C.C.; CROWCROFT, N.S.; DAVIES, N.W.; BORCHERT, M.; THOMAS, S.L. Challenge of the unknown. A systematic review of acute encephalitis in non-outbreak situations. **Neurology**, v.75, n.10, p.924–932, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f11d65>

GRIS, A.H.; ALVES, R.S.; CAMARGO, L.J.; BAUMBACH, L.F.; MENEGATT, J.C.O.; SILVA, E.M.S.; PESORA, F.F.; LIMA, R.P.; BERTOLINI, M.; FIÚZA, A.T.L.; WATANABE, T.T.N.; CANAL, C.W.; DRIEMEIER, D. Reemerging of encephalomyocarditis virus in pigs in Brazil: pathological and viral characterization. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.2023, n.1, p.6582778, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/6582778>

HALEY, D.J.; LANNING, S.; HENRICSON, K.E.; MARDIROSSIAN, A.A.; CIRILLO, I.; RAHE, M.C.; DUBOIS, R.M. Structure and antigenicity of the porcine astrovirus 4 capsid spike. **Viruses**, v.16, n.10, p.1596, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16101596>

HAMMERSCHMITT, M.E. 2021. Doenças do sistema nervoso central de suínos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2021. 52p.

HAMMERSCHMITT, M.E.; DE ALMEIDA, P.R.; DE CECCO, B.S.; LORENZETT, M.P.; SCHWERTZ, C.I.; DA CRUZ, R.A.S.; CAPRIOLI, R.A.; SCHUH, D.T.; DEMOLINER, M.; EISEN, A.K.A.; SPILKI, F.R.; PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D. Swine polioencephalomyelitis in Brazil: identification of Teschovirus A, Sapelovirus A, and Enterovirus G in a farm from southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.52, n.3, p.1617–1622, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00509-z>

HAMMERSCHMITT, M.E.; SCHWERTZ, C.I.; LOPES, B.C.; PEREIRA, P.R.; FRANDOLOSO, R.; DRIEMEIER, D. Clinical and pathological aspects of an outbreak of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, p. e07004, 2022.

HAUSE, B.M.; COLLIN, E.A.; PEDDIREDI, L.; YUAN, F.; CHEN, Z.; HESSE, R.A.; GAUGER, P.C.; CLEMENT, T.; FANG, Y.; ANDERSON, G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **The Journal of General Virology**, v.96, n.10, p.2994–2998, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000251>

HE, J.; SHI, K.; SHI, Y.; YIN, Y.; FENG, S.; LONG, F.; QU, S.; SONG, X. Development of a quadruplex RT-qPCR for the detection of porcine astrovirus, porcine sapovirus, porcine norovirus, and porcine rotavirus A. **Pathogens**, v.13, n.12, p.1052, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13121052>

HORAK, S.; KILLORAN, K.; LARSON, K.L. **Porcine Teschovirus**. Swine health information center and center for food security and public health, 2016. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-porcine-teschovirus>>. Acesso em: 22 Dez 2024.

HUANG, X.; HOU, J.; LE, X.; HOU, Y.; YANG, L.; LI, Q.; WANG, B.; XIA, X. Diversity of astroviruses in wild animals in Yunnan province, China. **Virology Journal**, v.21, n.1, p.51, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02314-0>

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2022 Release. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/astroviridae>. Acesso em: outubro 2024.

INDIK, S.; VALÍCEK, L.; SMÍD, B.; DVORÁKOVÁ, H.; RODÁK, L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. **Veterinary Microbiology**, v.117, n.2-4, p.276–283, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.020>

ITO, M.; KURODA, M.; MASUDA, T.; AKAGAMI, M.; HAGA, K.; TSUCHIAKA, S.; KISHIMOTO, M.; NAOI, Y.; SANO, K.; OMATSU, T.; KATAYAMA, Y.; OBA, M.; AOKI, H.; ICHIMARU, T.; MUKONO, I.; OUCHI, Y.; YAMASATO, H.; SHIRAI, J.; KATAYAMA, K.; MIZUTANI, T.; NAGAI, M. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination. **Infection, Genetics and Evolution**, v.50, p.38–48, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.008>

JOHNSON, C.; HARGEST, V.; CORTEZ, V.; MELIOPOULOS, V. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus pathogenesis. **Viruses**, v.9, n.1, p.22, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9010022>

JONASSEN, C.M.; JONASSEN, T.; SAIF, Y.M.; SNODGRASS, D.R.; USHIJIMA, H.; SHIMIZU, M.; GRINDE, B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. **Journal of General Virology**, v.82, n.5, p.1061-1067, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1061>

KATTOOR, J.J.; MALIK, Y.S.; SAURABH, S.; SIRCAR, S.; VINODHKUMAR, O.R.; BORA, D.P.; DHAMA, K.; GHOSH, S.; BANYAI, K.; TOUIL, N.; ABDEL-MONEIM, A. S.; VLASOVA, A.N.; KOBAYASHI, N.; SINGH, R.K. First report and genetic characterization of porcine astroviruses of lineage 4 and 2 in diarrhoeic pigs in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.66, n.1, p.47–53, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13058>

KIM, S.; JEONG, C.; YOON, S.; LEE, K.; YANG, M.; KIM, B.; LEE, S.; KANG, S.; KIM, W. Detection of atypical porcine pestivirus (APPV) from a case of congenital tremor in Korea. **Korean Journal of Veterinary Service**, v.40, p.209-213, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7853/kjvs.2017.40.3.209>

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of viruses: 9. Elsevier; 2011.

- 1 KOUKOU, G.; NIENDORF, S.; HORNEI, B.; SCHLUMP, J.U.; JENKE, A.C.;
2 JACOBSEN, S. Human astrovirus infection associated with encephalitis in an
3 immunocompetent child: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v.13, n.1,
4 p.341, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13256-019-2302-6>
5
- 6 KREUZER, S.; MACHNOWSKA, P.; ABMUS, J.; SIEBER, M.; PIEPER, R.; SCHMIDT,
7 M.F.; BROCKMANN, G.A.; SCHAREK-TEDIN, L.; JOHNE, R. Feeding of the probiotic
8 bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of
9 enteric viruses in pigs. **Veterinary Research**, v.43, n.1, p.58, 2012. DOI:
10 <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-58>
11
- 12 KRÓL, L.; TURKIEWICZ, D.; NORDBORG, K.; ENGLUND, E.; STENBERG, L.;
13 KARLSSON-LINDSJÖ, O.; LIND-KARLBERG, M.; PRONK, C.J. Astrovirus VA1/HMO
14 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: Significant role of
15 immune competence in virus control. **Pediatric Blood & Cancer**, v.68, n.12, p.
16 e29286, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.29286>
17
- 18 KRUMBHOLZ, A.; WURM, R.; SCHECK, O.; BIRCH-HIRSCHFELD, E.; EGERER, R.;
19 HENKE, A.; WUTZLER, P.; ZELL, R. Detection of porcine teschoviruses and
20 enteroviruses by lightCycler real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v.113,
21 n.1, p.51-63, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00227-1)
22
- 23 KUMARI, S.; SAIKUMAR, G.; DESINGU, P.A.; DAS, T.; SINGH, R.
24 Immunohistochemical detection of naturally occurring porcine Sapelovirus infection in
25 indian pigs. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.40, n.6, p. 676-684,
26 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2019.1675695>
27
- 28 KUMTHIP, K.; KHAMRIN, P.; SAIKRUANG, W.; KONGKAEW, A.; VACHIRACHEWIN,
29 R.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Detection and genetic characterization of porcine
30 astroviruses in piglets with and without diarrhea in Thailand. **Archives of Virology**,
31 v.163, n.7, p.1823–1829, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3806-x>
32
- 33 LAN, D.; JI, W.; SHAN, T.; CUI, L.; YANG, Z.; YUAN, C.; HUA, X. Molecular
34 characterization of a porcine astrovirus strain in China. **Archives of Virology**, v.156,
35 n.10, p.1869–1875, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1050-8>
36
- 37 LÁSZLÓ, Z.; PANKOVICS, P.; REUTER, G.; CSÁGOLA, A.; BODÓ, K.; GÁSPÁR, G.;
38 ALBERT, M.; BÍRÓ, H.; BÓROS, Á. Development and large-scale testing of a novel
39 one-step triplex RT-qPCR assay for simultaneous detection of "neurotropic" porcine
40 sapeloviruses, teschoviruses (*Picornaviridae*) and type 3 porcine astroviruses
41 (*Astroviridae*) in various samples including nasal swabs. **Viruses**, v.14, n.3, p.513,
42 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14030513>
43
- 44 LAURIN, M.A.; DASTOR, M.; L'HOMME, Y. Detection and genetic characterization of
45 a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. **Archives of Virology**, n.156,
46 v.11, p.2095–2099, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1088-7>

- LEE, M.H.; JEOUNG, H.Y.; PARK, H.R.; LIM, J.A.; SONG, J.Y.; NA, D.J. Phylogenetic analysis of porcine astrovirus in domestic pigs and wild boars in South Korea. **Virus Genes**, v.46, n.1, p.175-181, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0816-8>
- 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**, v.62, n.5, p.603-611, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12430>
- LIU, X.; ZHANG, W.; WANG, D.; ZHU, X.; CHEN, Y.; OUYANG, K.; WEI, Z.; LIU, H.; HUANG, W. Establishment of a multiplex RT-PCR method for the detection of five known genotypes of porcine astroviruses. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, p.684279, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684279>
- LULLA, V.; FIRTH, A.E. A hidden gene in astroviruses encodes a viroporin. **Nature Communications**, v.11, n.1, p.4070, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17906-x>
- LUM, S.H.; TURNER, A.; GUIVER, M.; BONNEY, D.; MARTLAND, T.; DAVIES, E.; NEWBOULD, M.; BROWN, J.; MORFOPOULOU, S.; BREUER, J.; WYNN, R. An emerging opportunistic infection: fatal astrovirus (VA1/HMO-C) encephalitis in a pediatric stem cell transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v.18, n.6, p.960-964, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/tid.12607>
- LUO, Z.; ROI, S.; DASTOR, M.; GALLICE, E.; LAURIN, M.A.; L'HOMME, Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, n.149, v.3-4, p.316-323, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.026>
- MACLACHLAN, N.J.; DUBOVI, E.J.; BARTHOLD, S.W.; SWAYNE, D.E.; WINTON, J.R.; **Fenner's Veterinary Virology**, 5 ed. Elsevier: Amsterdã, 2016.
- MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. Letter: Viruses in infantile gastroenteritis. **The Lancet**, v.2, n.7925, p.451-452, 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)90020-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)90020-3)
- MADSON, D.M.; ARRUDA, P.H.E.; ARRUDA, B.L. Nervous and locomotor systems. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZHANG, J. **Diseases of Swine**. 11 ed. Wiley-Blackwell, 2019. cap 19, p. 339-366.
- MATAJIRA, C.E.C.; MORENO, L.Z.; POOR, A.P.; GOMES, V.T.M.; DALMUTT, A.C.; PARRA, B.M.; OLIVEIRA, C.H.; BARBOSA, M.R.F.; SATO, M.I.Z.; CALDERARO, F.F.; MORENO, A.M. *Streptococcus suis* in Brazil: genotypic, virulence, and resistance profiling of strains isolated from pigs between 2001 and 2016. **Pathogens**, v.9, n.1, p.31, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9010031>
- MATIAS FERREYRA, F.S.; BRADNER, L.K.; BURROUGH, E.R.; COOPER, V.L.; DERSCHIED, R.J.; GAUGER, P.C.; HARMON, K.M.; MADSON, D.; PIÑEYRO, P.E.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; ZELLER, M.A.; ARRUDA, B.L.

Polioencephalomyelitis in domestic swine associated with porcine astrovirus type 3. **Veterinary Pathology**, v.57, n.1, p.82–89, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985819875741>

MENDENHALL, I.H.; SMITH, G.J.; VIJAYKRISHNA, D. Ecological drivers of virus evolution: astrovirus as a case study. **Journal of Virology**, v.89, n.14, p. 6978-6981, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02971-14>

MEYER, C.T.; BAUER, I.K.; ANTONIO, M.; ADEYEMI, M.; SAHA, D.; OUNDO, J.O.; OCHIENG, J.B.; OMORE, R.; STINE, O.C.; WANG, D.; HOLTZ, L.R. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade astroviruses in Kenya and the Gambia. **Virology Journal**, v.12, n.78, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0299-z>

MONINI, M.; DI BARTOLO, I.; IANIRO, G.; ANGELONI, G.; MAGISTRALI, C. F.; OSTANELLO, F.; RUGGERI, F. M. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. **Archives of Virology**, v.160, n.10, p.2547–2556, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2538-4>

MOR, S.K.; CHANDER, Y.; MARTHALER, D.; PATNAYAK, D.P.; GOYAL, S.M. Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.6, p.1064–1067, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638712458781>

MORENO, L.Z.; CASTILLA, K.S.; DE GOBBI, D.D.; COUTINHO, T.A.; FERREIRA, T.S.; MORENO, A.M. ERIC-PCR genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p.1420–1426, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000025>

MUÑOZ-GONZÁLEZ, S.; CANTURRI, A.; PÉREZ-SIMÓ, M.; BOHÓRQUEZ, J.A.; ROSELL, R.; CABEZÓN, O.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; GANGES, L. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.64, n.6, p.1645–1649, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12699>

NANTEL-FORTIER, N.; GAUTHIER, M.; L'HOMME, Y.; LACHAPELLE, V.; FRAVALO, P.; BRASSARD, J. The swine enteric virome in a commercial production system and its association with neonatal diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.266, p.109366, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109366>

NG, D.Y.M.; SUN, W.; SIT, T.H.C.; BRACKMAN, C.J.; TSE, A.C.N.; BUI, C.H.T.; TANG, A.W.Y.; WONG, A.N.C.; TSANG, A.T.L.; KOO, J.C.T.; CHENG, S.M.S.; PEIRIS, M.; CHIN, A.W.H.; POON, L.L.M. Genetic diversity of astroviruses detected in wild aquatic birds in Hong Kong. **Virology Journal**, v.21, n.1, p.153, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02423-w>

- OBRADOVIC, M.R.; SEGURA, M.; SEGALÉS, J.; GOTTSCHALK, M. Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. **Veterinary Research**, v.52, n.1, p.49, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00918-w>
- OPRIESSNIG, T.; XIAO, C.T.; HALBUR, P.G. Porcine astrovirus type 5-associated enteritis in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.181, p.38–46, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.09.014>
- PADMANABHAN, A.; HAUSE, B.M. Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease. **Archives of Virology**, v.161, n.9, p.2575–2579, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2937-1>
- PANKOVICS, P.; BÓROS, Á.; KISS, T.; DELWART, E.; REUTER, G. Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*). **Infection, Genetics and Evolution**, v.34, n.114–121, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.020>
- PARK, J.S.; JEONG, C.G.; CHAE, S.B.; YANG, M.S.; OH, B.; LEE, S.Y.; OEM, J.K. Porcine astrovirus infection in brains of pigs in Korea. **Viruses**, v.16, n.9, p.1372, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16091372>
- PAYNE, S. Family Astroviridae. In: **Viruses**, 1. ed. Elsevier, 2017, p.125-128. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00014-3>
- POSSATTI, F.; HEADLEY, S.A.; LEME, R.A.; DALL AGNOL, A.M.; ZOTTI, E.; DE OLIVEIRA, T.E.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, n.2, p.331-337, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12807>
- POSTEL, A.; HANSMANN, F.; BAECHLEIN, C.; FISCHER, N.; ALAWI, M.; GRUNDHOFF, A.; DERKING, S.; TENHÜND FELD, J.; PFANKUCHE, V.M.; HERDER, V.; BAUMGÄRTNER, W.; WENDT, M.; BECHER, P. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. **Scientific Reports**, v.6, n.27735, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep27735>
- PUENTE, H.; ARGUELLO, H.; CORTEY, M.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; MENCÍA-ARES, O.; PÉREZ-PÉREZ, L.; DÍAZ, I.; CARVAJAL, A. Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain. **Porcine Health Management**, v.9, n.1, p.29, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00326-w>
- RAHE, M.C.; MICHAEL, A.; PIÑEYRO, P.E.; GROELTZ-THRUSH, J.; DERSCHEID, R.J. Porcine Astrovirus 4 Detection in lesions of epitheliotropic viral infection in the porcine respiratory tract. **Transboundary Emerging Diseases**, v.2023, n.1, p.9113355, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/9113355>
- QUAN, P.L.; WAGNER, T.A.; BRIESE, T.; TORGERSON, T.R.; HORNIG, M.; TASHMUKHAMEDOVA, A.; FIRFH, C.; PALACIOS, G.; BAISRE-DE-LEON, A.;

- PADDOCK, C.D.; HUTCHINSON, S.K.; EGHOLM, M.; ZAKI, S.R.; GOLDMAN, J.E.; OCHS, H.D.; LIPKIN, W.I. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.918-925, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1606.091536>
- RAWAL, G.; FERREYRA, F.M.; MACEDO, N.R.; BRADNER, L.K.; HARMON, K.M.; ALLISON, G.; LINHARES, D.C.L.; ARRUDA, B.L. Ecology of porcine astrovirus type 3 in a herd with associated neurologic disease. **Viruses**, v.12, n.9, p.992, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12090992>
- RAWAL, G.; MATIAS FERREYRA, F.; MACEDO, N. R.; BRADNER, L.K.; HARMON, K.M.; MUELLER, A.; ALLISON, G.; LINHARES, D.C.L.; ARRUDA, B.L. Detection and cellular tropism of porcine astrovirus type 3 on breeding farms. **Viruses**, v.11, n.11, p.1051, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11111051>
- REUTER, G.; NEMES, C.; BÓROS, A.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; PANKOVICS, P. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. **Archives of Virology**, v.157, n.6, p.1143-1147, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1272-4>
- REUTER, G.; PANKOVICS, P.; BÓROS, A. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. **Archives of Virology**, v.156, n.1, p.125–128, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0827-5>
- SALAMUNOVA, S.; JACKOVA, A.; MANDELIK, R.; NOVOTNY, J.; VLASAKOVA, M.; VILCEK, S. Molecular detection of enteric viruses and the genetic characterization of porcine astroviruses and sapoviruses in domestic pigs from slovakian farms. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.1, p.313, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1640-8>
- SALLES, M.W.; SCHOLLES, S.F.; DAUBER, M.; STREBELOW, G.; WOJNAROWICZ, C.; HASSARD, L.; ACTON, A.C.; BOLLINGER, T. K. Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in western Canada. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.2, p. 367–373, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063871102300231>
- SANTOS, J.L.; BARCELLOS, D. Meningite estreptocócica. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELOS, D. **Doenças dos suínos**. 2. ed. Goiânia: Cãnone, 2012.
- SANTOS, J.L.; SOBESTIANSKY, J.; SANTOS, L. Doença de Glässer. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELOS, D. **Doenças dos suínos**. 2. ed. Goiânia: Cãnone, 2012, p. 135-140.
- SATO, M.; KURODA, M.; KASAI, M.; MATSUI, H.; FUKUYAMA, T.; KATANO, H.; TANAKA-TAYA, K.; Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. **Journal of Clinical Virology**, v.78, p.66-70, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.010>
- SAWANT, P.; KULKARNI, A.; MANE, R.; PATIL, R.; LAVANIA, M. Metatranscriptomic

assessment of diarrhoeic faeces reveals diverse RNA viruses in rotavirus group A infected piglets and calves from India. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.13, p.1258660, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1258660>

SHAN, T.; WANG, C.; TONG, W.; ZHENG, H.; HUA, X.; YANG, S.; GUO, Y.; ZHANG, W.; TONG, G. Complete genome of a novel porcine astrovirus. **Journal of Virology**, v.86, n.24, p.13820–13821, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02598-12>

SHIC – Swine Health Information Center. Porcine Teschovirus: 2021. Disponível em: <https://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2021/07/shic-factsheet-porcine-teschovirus-2021Jul7.pdf>. Acesso em: janeiro 2025.

SHIMIZU, M.; SHIRAI, J.; NARITA, M.; YAMANE, T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.2, p.201-206, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.201-206.1990>

SHIN, J.; CHOE, S.; HYUN, B.H.; AN, D.J. Phylogenetic analysis of kobuviruses and astroviruses from Korean wild boars: 2016-2018. **Archives of Virology**, v.166, n.9, p.2591–2596, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05164-1>

SOARES, T.C.; PAES, A.C.; MEGID, J.; RIBOLLA, P.E.; PADUAN, K.S.; GOTTSCHALK, M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy swine in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.78, n.2, p.145–149, 2014.

STAMELOU, E.; GIANTSIS, I.A.; PAPAGEORGIOU, K.V.; PETRIDOU, E.; DAVIDSON, I.; POLIZOPOULOU, Z.S.; PAPA, A.; KRITAS, S.K. Epidemiology of astrovirus, norovirus and sapovirus in greek pig farms indicates high prevalence of Mamastrovirus suggesting the potential need for systematic surveillance. **Porcine Health Management**, v.8, n.1, p.5, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00245-8>

SUN, N.; YANG, Y.; WANG, G.S.; SHAO, X.Q.; ZHANG, S.Q.; WANG, F.X.; TAN, B.; TIAN, F.L.; CHENG, S.P.; WEN, Y.J. Detection and characterization of avastrovirus associated with diarrhea isolated from minks in China. **Food and Environmental Virology**, v.6, n.3, p.169–174, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9155-3>

TASSONI, L.; ZAMPERIN, G.; SCHIAVON, E.; VENDRAMIN, V.; CAVICCHIO, L.; MION, M.; TONON, F.T.; MONNE, I.; BEATO, M. S. First whole genome characterization of porcine astrovirus detected in swine faeces in Italy. **Veterinaria Italiana**, v.55, n.3, p.221–229, 2019. DOI: <https://doi.org/10.12834/VetIt.1873.9956.1>

TEIXEIRA, M.L.; KUCHIISHI, S.S.; BRANDELLI, A. Isolation of *Haemophilus parasuis* from diagnostic samples in the south of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.122-125, 2011.

TREFNY, L. Massive illness of swine in Teschen area. **Zveroleki Obzori**, v. 23, p. 235-236, 1930.

ULLOA, J.C.; GUTIÉRREZ, M.F. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, n.7, p.569–577, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1139/w10-042>

VAN BORM, S.; VANNESTE, K.; FU, Q.; MAES, D.; SCHOOS, A.; VALLAEY, E.; VANDENBUSSCHE, F. Increased viral read counts and metagenomic full genome characterization of porcine astrovirus 4 and posavirus 1 in sows in a swine farm with unexplained neonatal piglet diarrhea. **Virus Genes**, v.56, n.6, p.696–704, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01791-z>

VANDERHALLEN, H.; KOENEN, F. Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.66, n.1, p.83-89, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)02214-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)02214-3)

VILCEK, S.; SALAMUNOVA, S.; JACKOVA, A. Genetic identification of astroviruses in wild boars. **Journal of Veterinary Science**, v.20, n.1, p.1–94, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.1.91>

WANG, J.; XU, C.; ZENG, M.; YUE, H.; TANG, C. Identification of a novel astrovirus in goats in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.96, p.105105, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105105>

WANG, Q.H.; KAKIZAWA, J.; WEN, L.Y.; SHIMIZU, M.; NISHIO, O.; FANG, Z.Y.; USHIJIMA, H. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. **Journal of Medical Virology**, v.64, n.3, p.245–255, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1043>

WILDI, N.; SEUBERLICH, T. Neurotropic astroviruses in animals. **Viruses**, v.13, n.7, p.1201, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13071201>

WILLIAMSON, S.; GROUP, P.E. Congenital tremor associated with atypical porcine pestivirus. **Veterinary Record**, v.180, n.2, p.42-43, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.j121>

WOHLGEMUTH, N.; HONCE, R.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus evolution and emergence. **Infection, Genetics and Evolution**, v.69, p.30-37, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.009>

WUNDERLI, W.; MEERBACH, A.; GÜNGÖR, T.; BERGER, C.; GREINER, O.; CADUFF, R.; TRKOLA, A.; BOSSART, W.; GERLACH, D.; SCHIBLER, M.; CORDEY, S.; MCKEE, T.A.; VAN BELLE, S.; KAISER, L.; TAPPAREL, C. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **PLoS One**, v.6, n.11, p. e27483, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027483>

XIAO, C.T.; GIMENEZ-LIROLA, L.G.; GERBER, P.F.; JIANG, Y.H.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. **Journal of General Virology**, v.94, n.3, p.570-582, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.048744-0>

XIAO, C.T.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Complete genome sequence of a newly identified porcine astrovirus genotype 3 strain US-MO123. **Journal of Virology**, v.86, n.23, p.13126, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02426-12>

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. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.70, n.3, p.305-308, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.70.305>

YASUMITSU, C.Y.; DALL AGNOL, A.M.; XAVIER, A.A.C.; SILVA, F.H.P.; CALLEGARI, M.A.; PEREIRA, U.P.; DA SILVA, C.A.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Porcine astrovirus 3 RNA in the central nervous system of weaned pigs with neurologic disease and polioencephalomyelitis in Brazil. **Microbiology Pathogenesis**, v.196, p.106917, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106917>

ZHANG, Q.; WEN, D.; LIU, Q.; OPRIESSNIG, T.; YU, X.; JIANG, Y. Universal primer multiplex PCR assay for detection and genotyping of porcine astroviruses. **Journal of Virological Methods**, v.322, p.114822, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114822>

ZHOU, W.; ULLMAN, K.; CHOWDRY, V.; REINING, M.; BENYEDA, Z.; BAULE, C.; JUREMALM, M.; WALLGREN, P.; SCHWARZ, L.; ZHOU, E.; PEDRERO, S.P.; HENNIG-PAUKA, I.; SEGALLES, J.; LIU, L. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five european countries. **Veterinary Microbiology**, v.182, p.75-81, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.019>

1 **4 HIPÓTESE**

2

3 PAstV3 é um agente etiológico envolvido em manifestações
4 neurológicas em suínos na região Sudeste do Brasil.

1 5 OBJETIVOS

2 5.1 OBJETIVO GERAL

3

4 Identificar e caracterizar molecularmente cepas de P_{As}tV3 em SNC
5 de suínos com quadro clínico neurológico em um rebanho com histórico de doença
6 neurológica.

7

8 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

- 10 • Descrever as alterações histopatológicas das amostras;
- 11 • Obter e quantificar fragmentos parciais dos genes *RdRp* de AstV
- 12 em tecidos do SNC de suínos desmamados com sinais clínicos neurológicos;
- 13 • Realizar diagnóstico diferencial para outros vírus neurotrópicos
- 14 em tecidos do SNC de suínos desmamados com sinais clínicos neurológicos;
- 15 • Quantificar a carga viral de P_{As}tV3 por meio da técnica de RT-
- 16 qPCR, usando o gene *Cap*, em tecidos do SNC de suínos desmamados e previamente
- 17 identificados com a infecção por P_{As}tV3;
- 18 • Sequenciar e analisar os *amplicons* de P_{As}tV3 obtidos nos
- 19 ensaios de RT-PCR para realizar a caracterização molecular;
- 20 • Avaliar a variabilidade genética das sequências de nucleotídeos
- 21 de P_{As}tV3 obtidas no sequenciamento e realizar análises filogenéticas.

6 ARTIGO PUBLICADO – PORCINE ASTROVÍRUS 3 RNA IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF WEANED PIGS WITH NEUROLOGICAL DISEASE AND POLIOENCEPHALOMYELITIS IN BRAZIL

Microbial Pathogenesis 196 (2024) 106917



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath



Porcine astrovirus 3 RNA in the central nervous system of weaned pigs with neurologic disease and polioencephalomyelitis in Brazil

Carolina Yuka Yasumitsu^a, Alais Maria Dall Agnol^{a,b}, Ana Aparecida Correa Xavier^c,
Flavia Helena Pereira Silva^c, Marco Aurélio Callegari^d, Ulisses de Pádua Pereira^e,
Caio Abércio da Silva^f, Selwyn Arlington Headley^c, Alice Fernandes Alfieri^{a,b},
Amauri Alcindo Alfieri^{a,b,*}

^a Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

^c Laboratory of Animal Pathology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

^d Aket Animal Research, Fartura, São Paulo, Brazil

^e Laboratory of Animal Bacteriology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

^f Animal Science Department, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Swine
Weaned piglets
Neurological disease
Polioencephalomyelitis
Central nervous system
Mamastrovirus

ABSTRACT

This report aims to describe the identification of porcine astrovirus 3 (PAstV3) RNA in the central nervous system (CNS) of weaned pigs with clinical signs of neurological disease associated with polioencephalomyelitis in southeastern Brazil. Three, 20–35 days-old piglets that died after clinical manifestations of a neurological syndrome were submitted to *post-mortem* evaluations. Tissue samples were examined by histopathology, bacteriology, and molecular assays (RT-PCR, nested-PCR, RT-qPCR, and Sanger sequencing) to detect the primary infectious disease agents associated with neurological disease in pigs. The principal neuropathological alterations occurred in the grey matter of the spinal cord and brainstem resulting in nonsuppurative poliomyelitis and rhombencephalitis. PAstV3 RNA was detected in the CNS samples of all piglets with histopathological evidence of disease and was confirmed by nucleotide sequencing. Nucleic acids from pathogens commonly associated with neurological diseases in pigs, such as porcine teschovirus, porcine sapelovirus, porcine enterovirus G, atypical porcine pestivirus, senecavirus A, and encephalomyocarditis virus was not detected by molecular assays in the three piglets. This is the first report of PAstV3 in piglets with neurological disease and lesions consistent with polioencephalomyelitis in Brazil. This report highlights the importance of monitoring health events that could compromise pig farming productivity and animal welfare.

1. Introduction

Astroviruses (AstVs) are found worldwide and have been linked to both subclinical and clinical infections in birds [1], several mammalian species [2,3], including humans [4]. Furthermore, there is a high potential for interspecies transmission and recombination events between different astrovirus strains [5]. These characteristics emphasize the significance of these viruses for one health [6].

Porcine astrovirus (PAstV) belongs to the family *Astroviridae*, genus *Mamastrovirus*, and species *Mamastrovirus suis* [7]. The viral particles are spherical, not enveloped, and have a diameter of 28–30 nm. The viral

genome is formed by single-stranded RNA with a size of 6.4–7.7 kb [8]. PAstV is an emerging virus of pigs with five lineages (PAstV1–PAstV5) [9], and infections can occur in asymptomatic or sick pigs [10,11].

Enteric diseases in pigs have often been associated with different PAstVs lineages, infections with a single lineage, associations between distinct lineages, or even with other etiological agents [10,12]. Neurological conditions have been more recently reported and attributed, especially to PAstV3 [13,14]. The initial descriptions of pigs with neurological manifestations associated with PAstV3 occurred between 2015 and 2016 in Hungary [14], followed by 2017 in the USA [13], and more recently (2020), in South Korea [unpublished data – Preprints

* Corresponding author. Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail address: alfieri@uel.br (A.A. Alfieri).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106917>

Received 20 May 2024; Received in revised form 2 July 2024; Accepted 3 September 2024

Available online 5 September 2024

0882-4010/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

version; Park et al., 2023]. Furthermore, the virus has been identified in clinically healthy piglets and sows from pig farms with previous reports of PASTV3-associated neurological disease [15,16]. Since outbreaks of novel infectious disease agents can have devastating economic impacts on pig production, monitoring these infections is necessary to develop adequate control and prophylactic measures.

In Brazil, only one description of PASTV was reported in fecal samples from healthy piglets, however, PASTV was not identified in the central nervous system (CNS) of piglets with neurological disease [17]. It must be highlighted that all previous descriptions of PASTV-associated neurological disease were observed in pigs from the Northern Hemisphere [13–15], and there are no reports of similar disease in the Southern Hemisphere. This report aims to describe the identification of PASTV3 RNA in the CNS of weaned pigs with clinical signs of neurological disease associated with polioencephalomyelitis in southeastern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Study location, clinical history, and sample collection

The outbreak occurred in 2023, at a multisite pig production farm with around 3,200 sows located in the state of São Paulo, Southeastern Brazil. The consulting veterinarian reported that, for over a year, weaned piglets at this farm have been showing neurological signs. The clinical manifestations included quadriplegia, opisthotonos, nystagmus, and occasional fever in suckling (from 20 days of age) and newly weaned piglets (up to 35 days old). It was noted that approximately 2 % of these piglets were affected, and the lethality rate was almost 100 %. Despite receiving broad-spectrum antimicrobials and anti-inflammatories the affected pigs showed no response to treatment.

In mid-April 2023, three weaned piglets, aged between 24 and 26 days, with similar neurological clinical signs but without receiving any supporting therapy, were found dead. All carcasses were submitted for *post-mortem* evaluation to determine the possible cause of the neurological syndrome within 4 h after death.

2.2. Pathological evaluation

Tissue samples of all major organs including the cerebrum, cerebellum, brainstem, cervical spinal cord, lungs, myocardium, liver, kidney, intestine, and spleen were collected. These samples were then fixed by immersion in 10 % buffered formalin solution, processed for routine histopathologic evaluation, and stained with the Hematoxylin and eosin (H&E) stain. Feces and duplicates of all organs (cerebrum, cerebellum, brainstem, cervical spinal cord, lungs, myocardium, liver, kidney, and spleen) collected were maintained at -80°C until used in molecular assays designed to detect agents associated with neurological diseases of swine.

2.3. Bacterial analysis

Aseptic swabs were collected from the surface of the CNS of the three piglets during *post-mortem* evaluations, promptly plated on 5 % sheep blood agar, and then incubated at 37°C for 24–48 h for bacterial culture and isolation.

2.4. Molecular detection of agents associated with neurological disease in swine

Suspensions (10 % w/v) were prepared from a 100 mg fragment of each organ collected during *post-mortem* evaluation and then mechanically disrupted using the TissueLyser LT (QIAGEN, Hilden, Germany). Fecal suspensions at 10–20 % (weight/volume) and disrupted tissue samples were homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2 and clarified by centrifugation at $1000\times g$ for 5 min. Nucleic

acid extraction was performed on 500 μL aliquots of the tissue/fecal suspensions that had been pre-treated with proteinase K and 1 % sodium dodecyl sulphate (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The nucleic acid was extracted by a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidine isothiocyanate methods [18,19]. The extracted nucleic acids were eluted in 50 μL of UltraPure™ DEPC-treated water (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80°C . Nuclease-free water was used as a negative control in all nucleic acid extractions and subsequent procedures.

Molecular assays were used to amplify the nucleic acids of the main infectious disease agents associated with neurological disease in pigs. The nucleic acids were tested using the semi-nested RT-PCR with Pan-Astrovirus primers [20]. The PASTV3 RNA presence in the tissue samples and Cq were determined using a TaqMan-based RT-qPCR assay. The RT-qPCR was carried out with SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) [16]. All reactions were performed in triplicate.

Additionally, other viral pathogens associated with the development of neurological diseases in swine were included in the analysis, such as porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV), porcine enterovirus G (EV-G) [21,22], atypical porcine pestivirus (APPeV [23], Senecavirus A (SVA) [24,25], and encephalomyocarditis virus (EMCV) [26]. The specific gene targets, primers, amplicon size, and type of molecular assays used to identify neurological infectious disease pathogens are provided in [Supplementary Table 1](#).

2.5. Sequencing and phylogenetic analysis

One amplicon from each piglet was chosen for nucleotide (nt) sequencing to confirm Pan-Astrovirus specificity. The amplicons were purified using a PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and quantified using Qubit® Fluorometer (Invitrogen® Life Technologies, Eugene, OR, USA). Direct sequencing was performed using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) with the forward and reverse primers in a 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems®).

Sequence quality analyses and consensus sequences were obtained using Phred and CAP3 homepages, respectively (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with nt sequences deposited in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool homepage (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Multiple and pairwise alignments with strains available in GenBank were performed with MEGA software version 7.0.26 [27], and the nt sequence identity matrix was constructed using BioEdit software version 7.2.5 [28]. A phylogenetic tree based on nt sequences was obtained using the Neighbor-Joining method [29] with the Tamura-Nei method [30] using MEGA software version 7.0.26 [27]. The bootstrapping probabilities were calculated using 1000 replicates.

3. Results

3.1. Pathological and bacteriological findings

The most important gross alterations were restricted to the brain of all weaned piglets evaluated and the lungs of piglets #1 and 3. There was marked congestion of the meningeal vessels of the cerebrum of all piglets, while rib impressions were prominent at the lungs of piglets #1 and 3. The histological evaluations revealed similar patterns of neurological disease consistent with viral infections in the CNS of all piglets. These lesions were predominant at the grey matter of the brainstem and the cervical region of the spinal cord but mild at the cerebellum and rare at the cerebral cortex. The intensity and distribution of the neurological lesions were more severe at the brainstem and spinal cord, followed by the cerebellum, and lastly at the cerebral cortex. Lesions at the brainstem and spinal cord were similar in intensity and distribution and consisted

of acute, moderate, multifocal to coalescing, nonsuppurative rhombencephalitis and poliomyelitis, respectively, having perivascular cuffings formed by one to two layers of lymphocytes, foci of neuronal necrosis, neuronophagia, and glial nodes (Fig. 1A–F). Histological alteration identified at the cerebellum consisted essentially of several perivascular cuffs observed predominantly at the white matter (Fig. 1G). In contrast, the histopathological alterations at the cerebral cortex were sparse in all piglets and consisted of rare perivascular cuffings formed by one layer of inflammatory cells (Fig. 1H). Additional neuropathological alterations included mild cerebral congestion in all piglets and focal perivascular hemorrhage at the spinal cord of piglet #1.

Significant non-neurological pathological alterations were observed in the lungs of all piglets, characterized as moderate to severe, diffuse, interstitial pneumonia. This was due to marked thickening of the alveolar walls caused by hyperplasia of type II pneumocytes with an influx of lymphocytes.

Bacteria were not isolated from the CNS swabs collected during the gross evaluation of these piglets.

3.2. Molecular detection of neurological agents and characterization of porcine astrovirus 3

PAstV RNA was amplified by the Pan-Astrovirus assay from the brainstem and spinal cord of all piglets, the cerebrum of two (# 1 and 2), as well as the cerebellum of piglet #1 with histopathological evidence of neurological disease. Furthermore, PAstV3 RNA was identified using specific RT-qPCR in most of the neuroanatomical regions that were positive with the consensus primers, except for the cerebrum of piglet #1 (Table 1). Additionally, PAstV3 RNA was only amplified from the myocardium of piglet #1. All other non-neurological organs evaluated, even the lungs with interstitial pneumonia, did not contain PAstV3 RNA. The nucleic acids of common agents (PTV, PSV, EV-G, SVA, APpEV, and

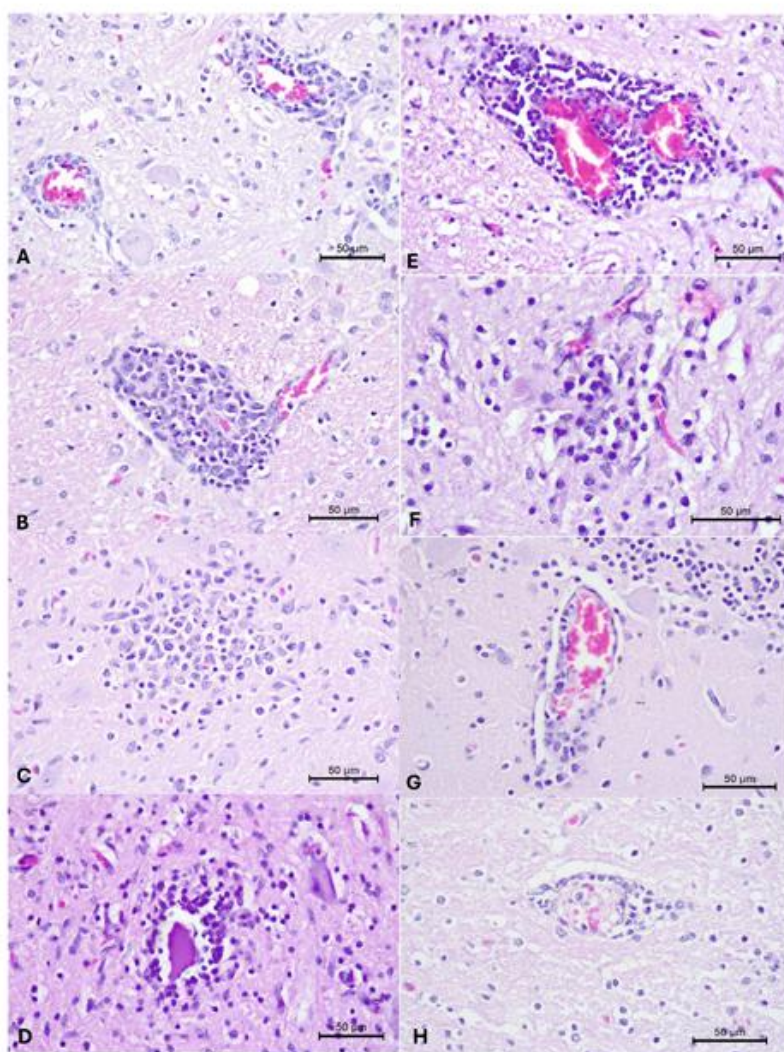


Fig. 1. Principal histopathological findings were observed at the brainstem (A–C), spinal cord (D–H), cerebellum (G), and cerebrum (H) of piglets infected with porcine astrovirus 3. Observe the lymphocytic perivascular cuffings (A–B), neuronal necrosis, and glial node (C) at the brainstem. There is severe neuronophagia (D), perivascular cuffing (E), and a glial node (F) at the cervical spinal cord. Observe perivascular cuffings formed by one layer of inflammatory cells at the cerebellum (G) and cerebrum (H). Hematoxylin and eosin stain. Bars: A–H, 50 µm.

Table 1

Detection of porcine astrovirus by semi-nested RT-PCR (Pan-Astrovirus) and RT-qPCR (PAstV3) assay in biological samples of weaned piglets with histopathological confirmation of neurological disease.

Piglet #	Organs	sn-RT-PCR	RT-qPCR – Cq
#1	Brainstem	+ve	30.42
	Cerebrum	+ve	ND
	Cerebellum	+ve	30.15
	Spinal cord	+ve	24.55
	Myocardium	+ve	30.51
	Feces	ND	ND
#2	Brainstem	+ve	24.67
	Cerebrum	+ve	26.56
	Cerebellum	ND	ND
	Spinal cord	+ve	26.49
	Myocardium	ND	ND
	Feces	+ve	ND
#3	Brainstem	+ve	31.19
	Cerebrum	ND	ND
	Cerebellum	ND	ND
	Spinal cord	+ve	32.51
	Myocardium	ND	ND
	Feces	ND	ND

Legend: sn-RT-PCR (semi-nested RT-PCR): Pan-Astrovirus; RT-qPCR: Porcine Astrovirus 3; Cq: quantification cycle; +ve: positive; ND: Not detected.

EMCV) associated with the development of neurological diseases in swine were not detected by their respective molecular assays in the three piglets.

The quantification cycles (Cq) ranged from 24.55 to 32.51, piglet #1 had the lowest Cq (24.55) in the spinal cord, while piglet #3 had the highest Cq (32.51) in the spinal cord. In the other tissues evaluated (non-CNS tissues), the RNA of PAstV3 was only identified in the myocardium of piglet #1 (Cq 30.51). In the lung, liver, and spleen it was not detected PAstV3 RNA in any of the piglets. Only the fecal sample from piglet #2 was positive by the conventional assay (Pan-Astrovirus). However, in the specific RT-qPCR for PAstV3, it was not possible to identify the presence of RNA.

Sequencing of the amplicons generated by the Pan-Astrovirus assay confirmed the presence of PAstV RNA in the tissue samples. The three nt sequences from the partial RdRp of PAstV were named BRA/UEL/SP-3156/23, BRA/UEL/SP-3157/23, and BRA/UEL/SP-3158/23 (GenBank accession numbers PP475135 to PP475137, respectively). Phylogenetic analyses revealed that the three sequences of PAstV identified in this study clustered with members of the PAstV3 group (Fig. 2). Furthermore, the PAstV strains herein identified show 87.3–90.6 % nt sequence identity with other PAstV3 strains previously identified in pigs with neurological disease, while with the other porcine astroviruses (PAstV1-2; and PAstV4-5) the nt identity was <60.9 %. The comparative analysis between the PAstV field strains identified in this study showed a range of 99.6–100 % nt identity to each other.

4. Discussion

The neurological manifestations described in these pigs were previously associated with infections by PAstV3 [13,31]. Furthermore, the neuropathological findings of rhombencephalitis and poliomyelitis herein diagnosed have been described in pigs experimentally [31] and spontaneously [13,32] infected with PAstV3. These initial histopathological findings of viral-induced lesions in the cervical spinal cord and brainstem of these weaned piglets contrasted previously diagnosed encephalitic diseases of pigs in Brazil, which prompted a suggestive diagnosis of astrovirus-related infections [33].

The presence of PAstV3 was confirmed by amplifying and quantifying the RNA from neuroanatomical regions with histopathological evidence of viral disease. This demonstrated that the virus was associated with the development of these lesions. Moreover, the non-detection

of the RNA of important neurological disease pathogens of swine, including PTV, PSV, EV-G, SVA, APPEV, and EMCV, with the non-isolation of bacteria suggests that these agents were not associated with the neurological manifestations observed. The results from this investigation differ from the previous description of PAstV in piglets from Brazil. That study investigated the etiology of neurological manifestations in piglets, during which PAstV was not detected within the CNS of affected animals but within fecal samples of healthy pigs [17]. Accordingly, the findings herein reported may represent the first identification of PAstV3 in association with neurological disease in pigs from Brazil and Latin America.

During the investigation, we observed neuropathological changes in weaned piglets, primarily in the grey matter of the spinal cord and brainstem, with significantly reduced histological patterns of viral-induced infections in the cerebellum and cerebrum. Experimentally induced and naturally occurring PAstV3 infections in pigs and other mammalian species showed similar selective tropism for specific neuroanatomical regions of the brain [13,31,32,34,35]. These findings suggest that the brainstem and cervical spinal cord must be collected and evaluated whenever neurologic astrovirus-related infections are suspected in mammalian species. Only spinal cord sections were evaluated in this study.

During this study, RNA of an astrovirus was detected in the fecal sample of piglet #2 using the Pan-Astrovirus assay but without corresponding quantification with the specific PAstV3 assay. These findings may suggest the possible identification of a distinct enteric lineage of PAstV, resulting in the non-detection by the RT-qPCR assay. Additionally, it is important to note that the Pan-Astrovirus molecular assay uses a semi-nested PCR [20]. However, the nested PCR assays have greater sensitivity when compared to quantitative PCR assays, including assays designed for AstV and PAstV3 [14]. Therefore, samples with low viral loads may have negative results in the RT-qPCR assay. The detection of the virus in feces is not a common finding in all infected animals. Even in experimental pigs infected with PAstV3, it was not possible to recover the virus in the feces of all animals [31].

The RNA of PAstV3 was identified in the spinal cord and brainstem of all pigs, whereas detection in the brain (piglet #2) and cerebellum (piglet #1) varied depending on the piglet. Regarding the detection of PAstV3 in non-neurological organs, the viral RNA was not detected in most non-neurological organs evaluated, except in the myocardium of piglet #1, which presented a Cq similar to that identified in the cerebellum and brainstem. However, the Cq detected in the cervical spinal cord was lower, suggesting a higher viral load. Similar findings were described in experimentally infected piglets, where PAstV3 was identified only in the neurological organs [31]. Our findings contrast with a study conducted in Hungary involving naturally infected pigs. In that study, PAstV-3 was detected in various tissues, including lymph nodes, tonsils, liver, lungs, and myocardium of symptomatic animals. However, the viral load in these tissues was lower than that found in neurological organs [14]. Therefore, tracking the presence of the virus in organs from the nervous system is necessary for more accurate future diagnoses.

The phylogenetic analysis of the nt fragment of the RdRp gene revealed five clades of PAstV. The sequences from each piglet originating in this study were grouped into the PAstV3 clade, along with the neurotropic strains identified in the USA and Hungary. The RdRp gene is conserved, but the nt sequence analysis showed that the field strains identified in this study have low similarity to other PAstV3 strains associated with neurological disease (87.3–90.6 %) and even lower similarity to strains from non-neurological PAstV (<60.9 %). This indicates a high genetic variability between these viral types.

The limitations of this study are concentrated on the small number of animals used and the absence of complementary assays to demonstrate the agent within the observed lesions. The use of immunohistochemistry (IHC) and/or *in situ* hybridization assays would have contributed greatly to the intralesional detection of viral antigens and proteins, respectively, thereby confirming infection. Accordingly, an international

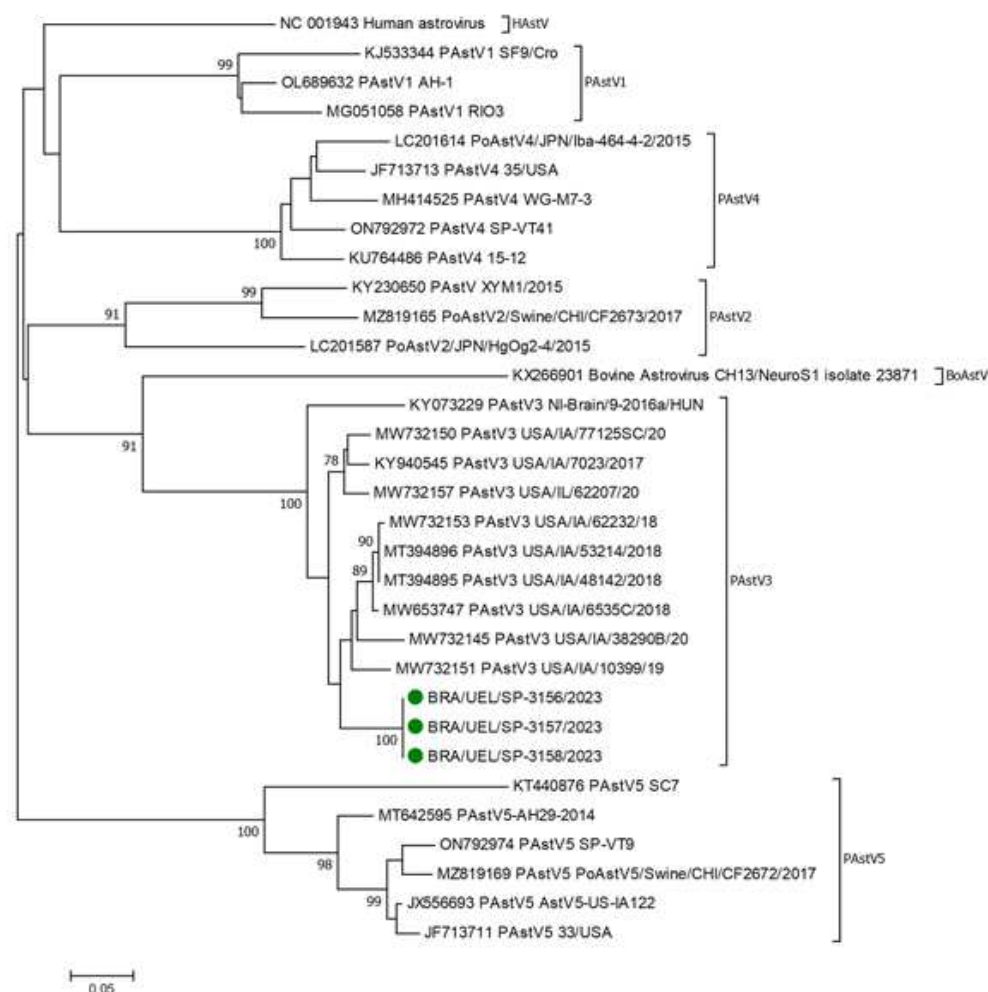


Fig. 2. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method of partial (269 nt) RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of porcine astrovirus (PAstV). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method [3] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 30 nucleotide sequences of PAstV, one bovine astrovirus, and another human astrovirus. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7. The PAstV3 strains identified in this study are highlighted with green-filled circles.

collaboration is being elaborated to detect viral particles either by IHC or *in situ* hybridization. Additionally, a retrospective study is being implemented to revise all histopathological diagnosis of porcine neurological disease over the last 10 years in an attempt to identify additional cases of PAstV3 in pigs.

5. Conclusion

In this report, we describe the first molecular detection of PAstV3 in weaned piglets with neurological disease and lesions consistent with polioencephalomyelitis in Brazil.

Data accessibility

Nucleotide sequences for PAstV3 data from this study are deposited in GenBank (accession numbers PP475135 to PP475137).

Ethics approval

This study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) and approved under identification number 11363.2015.16. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

CRedit authorship contribution statement

Carolina Yuka Yasumitsu: Writing – original draft, Software, Methodology. **Alais Maria Dall Agnol:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. **Ana Aparecida Correa Xavier:** Methodology. **Flavia Helena Pereira Silva:** Methodology. **Marco Aurélio Callegari:** Methodology. **Ulisses de Pádua Pereira:** Writing – review & editing, Supervision. **Caio Abércio da Silva:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Selwyn Arlington Headley:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation.

Alice Fernandes Alfieri: Writing – review & editing, Supervision.
Amauri Alcindo Alfieri: Writing – review & editing, Supervision,
 Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian Institutes for their financial support: the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). Carolina Y. Yasumitsu, Ana A. C. Xavier, and Flavia H. P. Silva are recipients of CAPES studentships. Ulisses P. Pereira, Selwyn A. Headley, Alice F. Alfieri, and Amauri A. Alfieri are recipients of CNPq fellowships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106917>.

References

References

- [1] L. Li, M. Sun, Y. Zhang, M. Liao, A review of the emerging poultry visceral gout disease linked to avian astrovirus infection, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022).
- [2] D. Comeau, M.T. Spinato, D. Ojic, R.A. Foster, J.L. Caswell, Bovine astrovirus and its role in lymphocytic encephalitis in cattle in Ontario, Canada, 1988–2019, *J. Vet. Diagn. Invest.* (2024) 10406387241237192.
- [3] K. Kuczer, A. Orłowska, M. Smreczak, M. Frant, P. Trębas, J. Rola, Prevalence of astroviruses in different animal species in Poland, *Viruses* 16 (2024).
- [4] P.S. Porto, A. Rivera, R. Moonranta, C.E. Wobus, Entry and egress of human astroviruses, *Adv. Virus Res.* 117 (2023) 81–119.
- [5] N. Wohlgenuth, R. Honce, S. Schultz-Cherry, Astrovirus evolution and emergence, *Infect. Genet. Evol.* 69 (2019) 30–37.
- [6] V. Cortez, V.A. Meliopoulos, E.A. Karlsson, V. Hargrett, C. Johnson, S. Schultz-Cherry, Astrovirus biology and pathogenesis, *Annu. Rev. Virol.* 4 (2017) 327–348.
- [7] ICTV, International committee on taxonomy of viruses, *Virus Taxonomy: 2023 Release* (2024). Available online: <https://ictv.global/taxonomy>. (Accessed 1 July 2024).
- [8] ICTV, International committee on taxonomy of viruses, Chapter Version: ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release (2009). <https://ictv.global/taxonomy>. (Accessed 30 April 2024).
- [9] C.T. Xiao, L.G. Giménez-Lirola, P.F. Gerber, Y.H. Jiang, P.G. Halbur, T. Opriessnig, Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types, *J. Gen. Virol.* 94 (2013) 570–582.
- [10] R. Kour, P. Kumar, N. Jindal, S. Kumari Minhas, R. Kumar, A.K. Gupta, A. Malik, Molecular detection and characterization reveals circulation of multiple genotypes of porcine astrovirus in Haryana, India, *Arch. Virol.* 166 (2021) 2847–2852.
- [11] S. Salamonova, A. Jackova, R. Mandelik, J. Novotny, M. Vlasakova, S. Vilcek, Molecular detection of enteric viruses and the genetic characterization of porcine astroviruses and sapoviruses in domestic pigs from Slovakian farms, *BMC Vet. Res.* 14 (2018) 313.
- [12] Vainhali, R. Gupta, M. Kumar, N. Bansal, Vivek, P. Kumar, P. Kumar, N. Jindal, Coinfection of porcine astrovirus and other porcine viruses in diarrhetic pigs in Haryana, India, *Arch. Virol.* 168 (2023) 246.
- [13] B. Arruda, P. Arruda, M. Hensch, Q. Chen, Y. Zheng, C. Yang, L.R.H. Gatto, F. M. Ferreyra, P. Gauger, K. Schwartz, L. Bradner, K. Harmon, B. Hause, G. Li, Porcine astrovirus type 3 in central nervous system of swine with polioencephalomyelitis, *Emerg. Infect. Dis.* 23 (2017) 2097–2100.
- [14] A. Boros, M. Albert, P. Pankovics, H. Biró, P.A. Pesavento, T.G. Phan, E. Delwart, G. Reuter, Outbreaks of neuroinvasive astrovirus associated with encephalomyelitis, weakness, and paralysis among weaned pigs, Hungary, *Emerg. Infect. Dis.* 23 (2017) 1982–1993.
- [15] G. Rawal, F.M. Ferreyra, N.R. Macedo, L.K. Bradner, K.M. Harmon, G. Allison, D.C. L. Linhares, B.L. Arruda, Ecology of porcine astrovirus type 3 in a herd with associated neurologic disease, *Viruses* 12 (2020).
- [16] G. Rawal, F.M. Ferreyra, N.R. Macedo, L.K. Bradner, K.M. Harmon, A. Mueller, G. Allison, D.C.L. Linhares, B.L. Arruda, Detection and cellular tropism of porcine astrovirus type 3 on breeding farms, *Viruses* 11 (2019).
- [17] M.E. Hammerschmitt, P.R. de Almeida, B.S. de Cecco, M.P. Lorenzetti, C. I. Schwartz, R.A.S. da Cruz, R.A. Caprioli, D.T. Schuh, M. Demoliner, A.K.A. Elsen, F.R. Spilki, S.P. Pavarini, D. Driemeier, Swine polioencephalomyelitis in Brazil: identification of teschovirus A, sapelovirus A, and enterovirus G in a farm from southern Brazil, *Braz. J. Microbiol.* 52 (2021) 1617–1622.
- [18] A.A. Alfieri, M.E. Parazzi, E. Takiuchi, K.C. Medici, A.F. Alfieri, Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002, *Trop. Anim. Health Prod.* 38 (2006) 521–526.
- [19] R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 495–503.
- [20] D.K.W. Chu, L.L.M. Poon, Y. Guan, J.S.M. Peiris, Novel astroviruses in insectivorous bats, *J. Virol.* 82 (2008) 9107–9114.
- [21] D.G. Domin, R.d.A. Leme, A.F. Alfieri, G.C. Alberton, A.A. Alfieri, First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil, *Trop. Anim. Health Prod.* 46 (2014) 523–528.
- [22] A. Krumbholz, R. Wurtz, O. Scheck, E. Birch-Hirschfeld, R. Egerer, A. Henke, P. Wutzler, R. Zell, Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR, *J. Virol Methods* 113 (2003) 51–63.
- [23] F. Possatti, S.A. Headley, R.A. Leme, A.M. Dall Agnol, E. Zotti, T.E.S. de Oliveira, A. F. Alfieri, A.A. Alfieri, Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets, *Transbound Emerg Dis* 65 (2018) 331–337.
- [24] C. Ferronato, R.A. Leme, J.A. Diniz, A.M.D. Agnol, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, Development and evaluation of a nested PCR assay for Senecavirus A diagnosis, *Trop. Anim. Health Prod.* 50 (2018) 337–344.
- [25] R.A. Leme, E. Zotti, B.K. Alcantara, M.V. Oliveira, L.A. Freitas, A.F. Alfieri, A. A. Alfieri, Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds, *Transbound Emerg Dis* 62 (2015) 603–611.
- [26] H. Vanderhallen, F. Koenen, Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Virol Methods* 66 (1997) 83–89.
- [27] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874.
- [28] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, pp. 95–98.
- [29] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [30] K. Tamura, M. Nei, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol. Biol. Evol.* 10 (1993) 512–526.
- [31] F.M. Ferreyra, P.E.H. Arruda, L.K. Bradner, K.M. Harmon, M. Zhang, L. Giménez-Lirola, B.L. Arruda, Experimental porcine astrovirus type 3-associated polioencephalomyelitis in swine, *Vet. Pathol.* 58 (2021) 1064–1074.
- [32] F.S.M. Ferreyra, L.K. Bradner, E.R. Burrough, V.L. Cooper, R.J. Derscheid, P. C. Gauger, K.M. Harmon, D. Madison, P.E. Pineyro, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, M.A. Zeller, B.L. Arruda, Polioencephalomyelitis in domestic swine associated with porcine astrovirus type 3, *Vet. Pathol.* 57 (2020) 82–89.
- [33] A.A.C. Xavier, A.M. Dull Agnol, C.A. Da Silva, F.H.P. Silva, M.M. Zanin, A.A. A. S. A. Headley, Outbreak of swine polioencephalomyelitis associated with possible infection by porcine astrovirus, in: 7^o Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária (CBPV), João Pessoa-PB, 2023.
- [34] G. Reuter, P. Pankovics, A. Boros, Nonsuppurative (aseptic) meningoencephalomyelitis associated with neurovirulent astrovirus infections in humans and animals, *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (2018).
- [35] N. Wildi, T. Seuberlich, Neurotropic astroviruses in animals, *Viruses* 13 (2021).

Supplementary Table 1. Targets genes, primers, and amplicon size of the molecular assays used to identify agents of neurologic disease pathogens of in pigs

Neurological pathogen	Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Assay	Reference
Pan astrovirus	RdRp	Fw-1 Fw-2 Rv Fw-3 Fw-4	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA GGYTTKACCCACATNCCRAA CGKTAYGATGGKACKATHCC AGGTAYGATGGKACKATHCC	422	Semi-nested-RT-PCR	(1)
PastV3	Capsid	Fw Rv Probe	ATGACYCTCTATGGGAAACTCCTT GTGCCTRGCAACAACCTCCAA FAM-TTGGCCAYAACCTCCCTGA-MGB	110	RT-qPCR	(2)
Porcine teschovirus	5 -NTRs	pev-1a pev-1e pev-1c pev-1d	AGTTTTGGATTATCTTGTGCCC CGCGACCCTGTCAGGCAGCAC TGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAG GCTGGTGGGCCCCAGAGAAATCTC	158	Nested-RT-PCR	(3)
Porcine sapelovirus	5 -NTRs	pev-8e pev-8f pev-8g pev-8h	CTTAAGGTGGTTGTATCCCCTAC TTCAACTGACTATACTAGTTACAGG ATGGCAGTAGCGTGGCGAGCTAT GTAATGCCAAGAGCATGCGCCA	212	Nested-RT-PCR	(3)
Enterovirus G	5 -NTRs	pev-9a pev-9b pev-9c pev-9e	GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG GTTAGGATTAGCCGCATTTCAGGGG	313	Nested-RT-PCR	(3)
Atypical porcine pestivirus	NS2/3	APPV-2/3-Fw1 APPV-2/3-Rv2 APPV-2/3-Rv3	GCAAAGAAGAATGACTC GGTTTGTCTCATTGCTC CCATGTTCTTGGGATTG	368	Semi-nested-RT-PCR	(4)
Encephalomyocarditis virus	3D	P1 P2	CCCTACCTCACGGAATGGGGCAAAG GGTGAGAGCAAGCCTCGCAAAGACAG	285	RT-PCR	(5)
Seneca Valley virus	VP3/VP1	SVV-2682FW SVV-3224RV SVV-2730FW SVV-3046RV	TTCCACTCCACCGACAACG GATACCTTCCCACCCTTGC ACTGACACCGATTTCTCTG CTAAAGTAAGTGAAACAGGC	316	Nested-RT-PCR	(6, 7)

References

1. Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol*. 2008;82(18):9107-14.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00857-08>
2. Rawal G, Ferreyra FM, Macedo NR, Bradner LK, Harmon KM, Mueller A, *et al*. Detection and Cellular Tropism of Porcine Astrovirus Type 3 on Breeding Farms. *Viruses*. 2019;11(11). <https://doi.org/10.3390/v11111051>
3. Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Henke A, *et al*. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods*. 2003;113(1):51-63. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00227-1)
4. Possatti F, Headley SA, Leme RA, Dall Agnol AM, Zotti E, de Oliveira TES, *et al*. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(2):331-7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12807>
5. Vanderhallen H, Koenen F. Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1997;66(1):83-9. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)02214-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)02214-3)
6. Feronato C, Leme RA, Diniz JA, Agnol AMD, Alfieri AF, Alfieri AA. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis. *Trop Anim Health Prod*. 2018;50(2):337-44. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1436-z>
7. Leme RA, Zotti E, Alcântara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, *et al*. Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds. *Transbound Emerg Dis*. 2015;62(6):603-11. <https://doi.org/10.1111/tbed.12430>

1 **7 CONSLUSÕES**

2 Este estudo descreveu a realização da primeira confirmação
3 molecular na América do Sul, especificamente na região Sudeste do Brasil, de PAstV3
4 por meio de diagnóstico molecular em suínos desmamados com doença neurológica
5 e lesões histopatológicas compatíveis com polioencefalomielite. A histopatologia
6 revelou a presença de congestão em meninges, com lesões predominantes na
7 substância cinzenta do tronco cerebral e na região cervical da medula espinhal, com
8 intensidades e distribuição consistentes com encefalite aguda moderada, multifocal a
9 coalescente e não supurativa. A quantificação viral nas amostras foi equivalente aos
10 resultados da histopatologia, com Ct menor em amostras que apresentaram lesões
11 com maior intensidade. Outros agentes etiológicos virais e bacterianos, com potencial
12 neurotrópico não foram detectados nessas amostras.

13 O número crescente de descrições de AstV neurotrópicos em
14 humanos e suínos destaca a importância da inclusão deste vírus na rotina de
15 diagnóstico de doenças neurológicas. Considerando que o potencial zoonótico de
16 PAstV neurotrópicos é uma questão de relevância epidemiológica no âmbito da
17 “Saúde Única”.

1 **8 PERSPECTIVAS**

2 PAstV3 é um vírus neurotrópico emergente e desde 2017 identificado
3 como agente etiológico de doenças neurológicas em suínos em diferentes
4 continentes. Com potencial para desencadear surtos de grande escala em granjas,
5 sua presença representa uma preocupação crescente para a suinocultura. No Brasil,
6 um dos maiores produtores de carne suína do mundo, os prejuízos econômicos
7 associados à infecção do sistema nervoso central por PAstV3 poderão ser
8 significativos. A introdução de um novo agente etiológico de doenças neurológicas
9 reforça a necessidade da realização de estudos com foco na patogenia da infecção,
10 monitoramento dos tipos de PAstV circulantes nos rebanhos do Brasil, além do
11 desenvolvimento e avaliação de estratégias eficazes de controle e profilaxia para
12 mitigar impactos na cadeia produtiva suína.

ANEXOS

ANEXO A

Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab®)
4. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen®)
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen®)
7. Ácido fosfotúngico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) P.M. 2,88 (Dinâmica®)
8. Ágar Mueller Hinton (Kasvi®)
9. Agarose (Invitrogen Life Technologies®)
10. Água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Invitrogen Life Technologies®)
11. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth®)
13. Bicarbonato de sódio, P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec®)
14. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems®)
15. Brometo de etídeo ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma®)
16. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen Life Technologies®)
17. Cloreto de magnésio 50mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies®)
18. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
19. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
20. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
21. Dimetil sulfóxido (DMSO) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$) (Sigma®)
22. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma®)
23. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies®)
24. DNA Ladder (100 pb) (Invitrogen Life Technologies®)
25. 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®)
26. Duodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Invitrogen Life Technologies®)
27. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco BRL®)
28. Eosina (Nuclear®)
29. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies®)
30. Formaldeído P.A. (Vetec®)
31. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth®)
32. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merk®)
33. Fosfato de sódio monobásico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen®)
34. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen®)
35. Hematoxilina (Nuclear®)
36. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
37. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
38. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
39. Metanol P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
40. *M-MLV™ Reverse Transcriptase 200 units* (Invitrogen Life Technologies®)
41. Oligonucleotídeo iniciadores (*primers e probe*)
- reverse PanAstV-Rv (RdRp) (reverse; 5' - TTTGGTCCNCCNCTCCAAA -3')

- Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) RdRp
- *forward* PanAstV-Fw1 (RdRp) (forward; 5'-GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA -3') Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) 422 pb
 - *forward* PanAstV-Fw2 (RdRp) (forward; 5'-GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA -3') Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) 422 pb
 - *reverse* PanAstV-Rv (RdRp) (reverse; 5'-GGYTTKACCCACATNCCRAA -3') Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) 422 pb
 - *forward* PanAstV-Fw3 (RdRp) (forward; 5'-CGKTAYGATGGKACKATHCC -3') Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) 422 pb
 - *forward* PanAstV-Fw4 (RdRp) (forward; 5'-AGGTAYGATGGKACKATHCC -3') Chu *et al.* 2008 – 200 pmol (Exxtend®) 422 pb
 - *forward* PAsV3-Fw (RT-qPCR) (Capsid) (forward; 5'-ATGACYCTCTATGGGAACTCCTT -3') Rawal *et al.* 2019 – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 110 pb
 - *reverse* PAsV3-Rv (RT-qPCR) (Capsid) (forward; 5'-GTGCCTRGCAACAACCTCCAA -3') Rawal *et al.* 2019 – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 110 pb Capsid
 - *probe* PAsV3 (RT-qPCR) (Capsid) (FAM-TTGGCCAYAACCTCCCTGA-MGB) Rawal *et al.* 2019 – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 110 pb Capsid
 - PEV-1a (5' NTR/PEV) (forward; 5'-AGTTTTGGATTATCTTGTGCCC -3') - *nucleotide* (nt) 76-97 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 158 pb
 - PEV-1e (5' NTR/PEV) (reverse; 5'-CGCGACCCTGTCAGGCAGCAC -3') - *nucleotide* (nt) 391-371 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 158 pb
 - PEV-1c (5' NTR/PEV) (forward; 5'-TGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAG -3') - *nucleotide* (nt) 178-200 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 158 pb
 - PEV-1d (5' NTR/PEV) (reverse; 5'-GCTGGTGGGCCCCAGAGAAATCTC -3') - *nucleotide* (nt) 335-312 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 158 pb
 - PEV-8e (5' NTR/PEV) (forward; 5'-CTTAAGGTGGTTGTATCCCCTAC -3') - *nucleotide* (nt) 236-45 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 212 pb
 - PEV-8f (5' NTR/PEV) (reverse; 5'-TTCAACTGACTATACTAGTTACAGG -3')

- *nucleotide* (nt) 435-411 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 212 pb
- PEV-8g (5' NTR/PEV) (forward; 5'- ATGGCAGTAGCGTGGCGAGCTAT -3') - *nucleotide* (nt) 131-153 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 212 pb
- PEV-8h (5' NTR/PEV) (reverse; 5'- GTAATGCCAAGAGCATGCGCCA -3') - *nucleotide* (nt) 342-321 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 212 pb
- Pev-9a (5' NTR/PEV) (forward; 5'- GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA -3') - *nucleotide* (nt) 96-117 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 313 pb
- PEV-9b (5' NTR/PEV) (reverse; 5'- ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC -3') - *nucleotide* (nt) 586-566 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 313 pb
- PEV-9c (5' NTR/PEV) (forward; 5'- CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG -3') - *nucleotide* (nt) 197-217 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 313 pb
- PEV-9e (5' NTR/PEV) (reverse; 5'- GTTAGGATTAGCCGCATTCAGGGG -3') - *nucleotide* (nt) 509-486 Krumbholz *et al.* (2003) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 313 pb
- APPV-2/3-Fw1 (forward; 5'- GCAAAGAAGAATGACTC -3') Possatti *et al.* (2018) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 368 pb
- APPV-2/3-Rv2 (reverse; 5'- GGTTTGTCTCATTGCTC -3') Possatti *et al.* (2018) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 368pb
- APPV-2/3-Rv3 (reverse; 5'- CCATGTTCTTGGGATTG -3') Possatti *et al.* (2018) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 368 pb
- P1 (3D) (forward; 5'- CCCTACCTCACGGAATGGGGCAAAG -3') Vanderhallen *et al.* (1997) – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 285 pb
- P2 (3D) (reverse; 5'- GGTGAGAGCAAGCCTCGCAAAGACAG -3'; *nucleotide* (nt) xxxx-xxxx) Vanderhallen *et al.* 1997 – 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 285 pb
- SVV-2682FW (VP1/SVV) (forward; 5'- TTCCACTCCACCGACAACG -3') – Ferronato *et al.* (2017) 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 316 pb
- SVV-3224RV (VP1/SVV) (reverse; 5'- GATACCTTCCCACCCTTGC -3') - Ferronato *et al.* (2017) 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 316 pb
- SVV-2730FW (VP1/SVV) (forward; 5'- ACTGACACCGATTTCTCTG -3') -

Ferronato *et al.* (2017) 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 316 pb

- SVV-3046RV (VP1/SVV) (reverse; 5' - CTAAAGTAAGTGAAACAGGC -3') -
Ferronato *et al.* (2017) 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®) 316 pb

42. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
43. Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies™)
44. Proteinase K (10mM Tris; 1mM ethylenediamine tetra-acetic acid [EDTA]; 0.5% Nonidet P40; 1% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 0.2mg/mL proteinase K) (Invitrogen Life Technologies™)
45. PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Life Technologies™)
46. RT-buffer (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
47. SuperScript™ III Reverse Transcriptase 200 units (Invitrogen Life Technologies™)
48. SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System 100 reactions (Invitrogen Life Technologies®)
49. QuantiT™ dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies™)
50. TripLE™ Express Stable Trypsin-like Enzyme (Gibco®)
51. Tris (Nuclear®)
52. Triton x-100 (Synth®)
53. Xileno P.A. (Nuclear®)

ANEXO B

Soluções e tampões

• Diluição dos primers

Vírus/gene	Primers Forward	Primers Reverse
Semi-nested-RT-PCR PanAst/RdRp Pan Astrovírus	- Primer PanAstV-Fw1 (RT-PCR) Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	- Primer PanAstV-Rv (RT-PCR) Concentração: 85 nmol $85 \times 1000 = 85000 \text{ pmol}$ $85000 / 200 = 425 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
	- Primer PanAstV-Fw2 (RT-PCR) Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	- Primer PanAstV-Rv1 (PCR/semi-nested) Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
	- Primer PanAstV-Fw3 (semi-nested) Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	
	- Primer PanAstV-Fw4 (semi-nested) Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	

Nested-RT-PCR PEV/5-NTRs Teschovirus A	- Primer PEV-1a (RT-PCR) Concentração: 30,6 nmol $30,6 \times 1000 = 30600$ pmol $30600 / 200 = 153$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-1e (RT-PCR) Concentração: 29,7 nmol $29,7 \times 1000 = 29700$ pmol $29700 / 200 = 148,5$ µL de água ultrapura
	- Primer PEV-1c (<i>Nested</i>) Concentração: 24,8 nmol $24,8 \times 1000 = 24800$ pmol $24800 / 200 = 124$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-1d (<i>Nested</i>) Concentração: 32,8 nmol $32,8 \times 1000 = 32800$ pmol $32800 / 200 = 164$ µL de água ultrapura
Nested-RT-PCR PEV/5-NTRs Sapelovirus A	- Primer PEV-8e (RT-PCR) Concentração: 30,7 nmol $30,7 \times 1000 = 30700$ pmol $30700 / 200 = 153,5$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-8f (RT-PCR) Concentração: 32,9 nmol $32,9 \times 1000 = 32900$ pmol $32900 / 200 = 164,5$ µL de água ultrapura
	- Primer PEV-8g (<i>Nested</i>) Concentração: 39,7 nmol $39,7 \times 1000 = 39700$ pmol $39700 / 200 = 198,5$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-8h (<i>Nested</i>) Concentração: 28,1 nmol $28,1 \times 1000 = 28100$ pmol $28100 / 200 = 140,5$ µL de água ultrapura
Nested-RT-PCR PEV/5-NTRs Enterovírus G	- Primer PEV-9a (RT-PCR) Concentração: 37,1 nmol $37,1 \times 1000 = 37100$ pmol $37100 / 200 = 185,5$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-9b (RT-PCR) Concentração: 40,5 nmol $40,5 \times 1000 = 40500$ pmol $40500 / 200 = 202,5$ µL de água ultrapura
	- Primer PEV-9c (<i>Nested</i>) Concentração: 28,6 nmol $28,6 \times 1000 = 28600$ pmol $28600 / 200 = 143$ µL de água ultrapura	- Primer PEV-9e (<i>Nested</i>) Concentração: 32,1 nmol $32,1 \times 1000 = 32100$ pmol $32100 / 200 = 160,5$ µL de água ultrapura

Semi-nested-RT-PCR APPeV/NS2/3 Pestivírus suíno atípico	- Primer APPV-2/3-Fw1 (RT-PCR/semi-nested-PCR) Concentração: 47 nmol $47 \times 1000 = 47000$ pmol $47000 / 200 = 235$ µL de água ultrapura	- APPV-2/3-Rv2 (RT-PCR) Concentração: 57,1 nmol $57,1 \times 1000 = 57100$ pmol $57100 / 200 = 285,5$ µL de água ultrapura
		- APPV-2/3-Rv2 (semi-nested) Concentração: 28,9 nmol $28,9 \times 1000 = 28900$ pmol $28900 / 200 = 144,5$ µL de água ultrapura
PCR EMCV/3D Vírus da encefalomiocardite	- Primer P1-Fw (PCR) Concentração: 37,1 nmol $37,1 \times 1000 = 37100$ pmol $37100 / 200 = 185,5$ µL de água ultrapura	- Primer P2-Rv (PCR) Concentração: 40,6 nmol $40,6 \times 1000 = 40600$ pmol $40600 / 200 = 203$ µL de água ultrapura
Nested-RT-PCR SVV/VP1 Senecavírus	- Primer SVV-2682FW (RT-PCR) Concentração: 41,1 nmol $41,1 \times 1000 = 41100$ pmol $41100 / 200 = 205,5$ µL de água ultrapura	- Primer SVV-3224RV (RT-PCR) Concentração: 30,7 nmol $30,7 \times 1000 = 30700$ pmol $30700 / 200 = 153,5$ µL de água ultrapura
	- Primer SVV-2730FW (RT-PCR) Concentração: 46,7 nmol $46,7 \times 1000 = 46700$ pmol $46700 / 200 = 233,5$ µL de água ultrapura	- Primer SVV-3046RV (RT-PCR) Concentração: 42,5 nmol $42,5 \times 1000 = 42500$ pmol $42500 / 200 = 212,5$ µL de água ultrapura

RT-qPCR PAstV3/Cap Astrovírus suíno 3	- Primer qPAstV3-Fw Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	- Primer qPAstV3-Rv Concentração: 43 nmol $43 \times 1000 = 43000 \text{ pmol}$ $43000 / 200 = 215 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
Probe RT-qPCR PAstV3/Cap Astrovírus suíno 3	- Probe qPAstV3 Concentração: 200 pmol e 70 μL ([] final 250 nm)	

Solução estoque: Ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10x [].
Primer mãe (200pmol/ μL).

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura.
Primer uso 1x (20 pmol/ μL).

• Diluição de dNTP

- Solução estoque (100 mM) – 100 μL de cada dNTP
- Solução uso (10 mM) – 10 μL da solução estoque + 90 μL de água ultrapura 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 2%

- 1 g de agarose
- 50 mL de tampão TBE 1x
- 20 μL de brometo de etídio

• Hidratação da sílica

- 6 g de sílica (SIGMA®)
- Adicionar 50 mL de água ultrapura autoclavada

- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 44 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar

• **Meio Mueller Hinton enriquecido com 5% sangue de ovino desfibrinado**

- 36 g de pó de ágar Mueller Hinton (KASVI®)
- Adicionar 1000 mL de água destilada
- Aquecer até ferver e misturar até dissolver completamente.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Adicionar 50 mL de sangue de ovino desfibrinado.
- Distribuir em placas de Petri.

• **SDS 10%**

- 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
- Água bidestilada qsp. 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 100x

• **Solução L2**

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

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

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

- Água bidestilada qsp 100 mL

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

- 107,8 g Tris (0,89 M)
- 55,03 g Ácido bórico (0,89 M)
- 7,45 g EDTA (0,02 M)
- Água bidestilada qsp 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 qsp 500 mL

ANEXO C

Protocolos e 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
- 900 µL de PBS
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 5000 x g/3 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração

2. *Suspensão de tecido/órgão – extração bruta*

- 100 mg do fragmento de órgão
- Macerar
- 900 µL de PBS
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 3000 x g/10 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração
- 500 µL da suspensão do fragmento de órgão
- 10 µL de tampão de lise (Proteinase K)
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar a 56 °C/30 min
- Utilizar todo o volume para a extração do ácido nucléico

3. *Extração do ácido nucleico*

Fase I – Fenol/clorofórmio/álcool isolamílico

- 500 µL da suspensão fecal da suspensão de tecido
- Adicionar 50 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/20 min

- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x *g*/10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g*/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de acetona PA gelada
- Homogeneizar em vórtex

- 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 vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x *g*/4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar à -20 °C até a utilização

• **Semi-nested-RT-PCR para Pan-Astrovírus (RdRp) primers Chu *et al.* 2008**

Desnaturação (65 °C/5 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Primer</i> PanAstV-R (20 pmol)	2
dNTP (2,5 mM)	1
Água ultrapura	6
RNA	5
Volume final	14

Transcrição reversa (55°C/50 min; 70 °C/15 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 5X	4
DTT (100 mM)	1
<i>SuperScript</i> ™ III (200 U/µL)	1
Produto da desnaturação	14
Volume final	20

Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	
Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> ®Taq DNA Polymerase (5U/μL)	0,5
<i>Primer</i> PanAstV-Fw1 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> PanAstV-Fw2 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> <i>Primer</i> PanAstV-Rv (20 pmol)	1
Água ultrapura	37
cDNA	2
Volume final	50

Mix Reação semi-Nested-PCR	
Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> ®Taq DNA Polymerase (5U/μL)	0,5
<i>Primer</i> PanAstV-Fw3 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> PanAstV-Fw4 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> <i>Primer</i> PanAstV-Rv (20 pmol)	1
Água ultrapura	38
Produto da PCR	1
Volume final	50

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR e semi-Nested para Pan-Astrovírus (RdRp)

Reação	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos (PCR)	Nº de Ciclos (semi-Nested)
Desnaturação	94 °C	5 min	1	1
Desnaturação	94 °C	30 s	30	40
Anelamento	50 °C	30 s	30	40
Extensão	72 °C	30 s	30	40
Extensão final	72 °C	7 min	1	1

• Tamanho esperado dos produtos amplificados

Vírus	Gene	Produto da PCR/Nested-PCR (pb)
Pan astrovírus (Pan-AstV)	RdRp	422
Teschovírus suíno (PTV)	5 – NTR's	158
Sapelovírus suíno (PSV)	5 – NTR's	212
Enterovírus G (EVG)	5 – NTR's	313
Pestivírus suíno atípico (APPeV)	NS2/3	368
Vírus da Encefalomiocardite (EMCV)	3D	285
Senecavírus (SVA)	VP3/VP1	316

- **Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) – PastV3 (Cap) – fragmento de 110pb**

Mix Reação RT-qPCR	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Mix One Step Invitrogen</i>	5,0
<i>Probe</i>	1,0
Primer PAsV A (<i>forward</i>)	0,8
Primer PAsV A (<i>reverse</i>)	0,8
ROX	0,1
Taq/SSIII	0,25
Água ultrapura	0,05
Amostra	2,0
Volume final	10,0

- **Ciclos de tempo e temperatura da RT-qPCR**

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
RT	50	15 min	1
Desnaturação inicial	95	5 min	1
Desnaturação	95	15 s	40
Extensão	60	30 s	40

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

- 1,0 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4
- 20 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

São utilizados 5 µL do *amplicon* e 1 µL do tampão de amostra. Corrida eletroforética sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes por 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 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.
3. Incubar o tubo a 50 °C/15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com coluna.
5. Centrifugar a 13.000 x *g*/1 min.
6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
7. Adicionar 500 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
8. Centrifugar a 13.000 x *g*/1 min.
9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
10. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
14. Centrifugar a 13.000 x *g*/1 min.
15. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20 °C.

- **Purificação direta de produto de PCR**

1. Adicionar 4 volumes do *Binding buffer* (B2) a 1 volume de reação de PCR.
2. Transferir a solução para uma coluna de purificação.
3. Centrifugar a 13.000 x *g*/1 min.
4. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.

5. Adicionar 650 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
6. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
11. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
12. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
13. 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 vórtex.
3. No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 2 µL do fragmento de DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 µL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 µL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex 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.

- **Sequenciamento pelo método Sanger**

Preparo de amostras para o sequenciamento

As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na tabela abaixo:

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/μL ou μg/mL)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/μL ou μM)
< 300	2	5
300 – 700	4	5
>700	10	10

Mix do sequenciamento

Reagente*	Volume
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	2,0 μL
Tampão 5x	1,5 μL
Água ultrapura autoclavada	0,5 μL
Volume final	4,0 μL

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 μL de amostra purificada + 1 μL de *primer*.

Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	15 s	35
Anelamento	50	15 s	35
Extensão	60	4 min	35

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

Precipitação com EDTA e Etanol

- Adicionar 10 µL da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (Applied Biosystems).
- Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.
- Adicionar 30 µL de etanol 100%.
- Homogeneizar lentamente a placa.
- Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar 10 µL de formamida (HIDI).
- Adicionar a septa.
- Homogeneizar a placa em vórtex.
- Submeter à placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI/3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

• **Hematoxilina-eosina (HE)**

- Xilol I – 20 min.
- Xilol II – 20 min.
- Álcool absoluto I – 2 min.
- Álcool absoluto II – 2 min.
- Álcool 95% I – 2 min.
- Álcool 95% II – 2 min.
- Lavar em água destilada – 2 min.

- Corar com hematoxilina (10 min).
- Lavar em água corrente por 10 min, desprezar a primeira água em recipiente apropriado.
- Álcool 95% – 1 min.
- Eosina – 1 min.
- Álcool 95% – 1 min.
- Álcool absoluto I – 2 min.
- Álcool absoluto II – 2 min.
- Xilol I – 2 min.
- Xilol II – 2 min.
- Montar as lâminas.

- **Cultivo bacteriano**

- Semear o material em ágar sangue de ovino desfibrinado a 5%.
- Incubar a 37 °C de 24 a 48 horas.

ANEXO D

Lista de softwares

- 1 • *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
- 2 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- 3 • *MEGA package software version 7*
- 4 (<http://www.megasoftware.net/>)
- 5 • *BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool*
- 6 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- 7 • *BioEdit software version 7.2.5*
- 8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)