



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FLAVIA MEGUMI MIYABE

**ROTA VIRUS B COMO AGENTE PRIMÁRIO DE DIARREIA  
EM LEITÕES NEONATOS**

---

Londrina  
2020

FLAVIA MEGUMI MIYABE

**ROTA VIRUS B COMO AGENTE PRIMÁRIO DE DIARREIA  
EM LEITÕES NEONATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Alice Fernandes Alfieri

Coorientador: Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina  
2020

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

M685 Miyabe, Flavia Megumi .  
Rotavirus B como agente primário de diarreia em leitões neonatos / Flavia Megumi Miyabe. - Londrina, 2020.  
77 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.  
Coorientador: Amauri Alcindo Alfieri.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Rotavirus B - Tese. 2. Caracterização molecular - Tese. 3. Surto de diarreia em leitões - Tese. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Alfieri, Amauri Alcindo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

FLAVIA MEGUMI MIYABE

**ROTAVIRUS B COMO AGENTE PRIMÁRIO DE DIARREIA EM  
LEITÕES NEONATOS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elisabete Takiuchi  
Universidade Federal do Paraná – UFPR Setor  
Palotina

---

Profa. Dra. Michele Lunardi  
Universidade de Cuiabá - UNIC

Londrina, 27 de novembro de 2020.

*À minha família e amigos*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Junji e Cecília (ambos *in memorian*), por terem sido meus maiores exemplos de força e integridade, e por sempre me incentivarem e me ensinarem valores que levarei para a vida toda.

Aos meus irmãos, Silvia e Mauro, por cuidarem de mim e serem meu apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos professores Amauri e Alice Alfieri, por me orientarem durante todos esses anos e pelo exemplo de profissionalismo.

Às professoras da banca, que dedicaram parte de seu tempo para sugestões e correções deste trabalho.

À todos os colegas do Laboratório de Virologia Animal que contribuíram na realização deste trabalho, em especial à Raquel e Alais, por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Ao Rafael, pelo companheirismo e por fazer tudo ficar mais leve.

À todos os meus amigos, em especial ao Marcos, por todos os conselhos, conversas e desconstruções. E à Ana, Andresa e Juliana, por fazerem meus dias mais divertidos durante toda essa etapa.

E, por fim, às agências de fomento (CNPq, CAPES e Fundação Araucária) e à Universidade Estadual de Londrina, por tornarem possível a realização deste trabalho, incentivando a pesquisa brasileira, que deve ser respeitada e valorizada sempre.

Muito obrigada.

*Isso de querer  
ser exatamente  
aquilo  
que a gente é  
ainda vai  
nos levar além*

Paulo Leminski

MIYABE, Flavia Megumi. **Rotavirus B como agente primário de diarreia em leitões neonatos**. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

A diarreia neonatal é um dos principais problemas sanitários na produção de suínos. Dentre os agentes etiológicos envolvidos nas doenças entéricas, rotavírus (RV) é considerado a principal causa de gastroenterite viral aguda em animais jovens. RV é membro da família *Reoviridae* e é classificado em nove espécies (A – I), das quais cinco já foram identificados em suínos (RVA, RVB, RVC, RVE e RVH). A espécie RVA é a mais prevalente e é considerada a mais importante e patogênica dentre os RV. No entanto, estudos conduzidos nos Estados Unidos e Brasil detectaram altas frequências de RVB em leitões com diarreia; porém, na maioria dos casos, em associação com outras espécies de RV, como RVA, RVC ou RVH. O objetivo desse estudo foi descrever a detecção de RVB suíno como agente causador primário de surtos de diarreia em leitões neonatos em rebanhos suínocolas brasileiros, assim como determinar o genotipo G das cepas identificadas. Noventa amostras, sendo 77 fezes diarreicas e 13 fragmentos de intestino delgado foram coletados durante surtos de diarreia em leitões neonatos provenientes de oito granjas suínocolas da região centro-oeste do Brasil. As amostras foram submetidas a RT-PCR para detecção de agentes virais entéricos e análises histopatológicas foram realizadas nos fragmentos de intestino. Além disso, duas amostras de fezes foram submetidas à microscopia eletrônica de transmissão (ME) e isolamento viral em cultivo de células. As amostras positivas para RVB foram submetidas à técnica de qRT-PCR para quantificação da carga viral, e análises filogenéticas da proteína VP7 de cepas selecionadas de RVB foram realizadas. Foi observada alta frequência de RVB (71,1%, 64/90), principalmente em infecção singular, associada com lesões histopatológicas acentuadas no intestino delgado dos leitões afetados. Partículas virais com morfologia semelhante à RV foram observadas por ME em uma amostra fecal positiva para RVB. Cargas virais moderadas a altas, de  $7,6 \times 10^2$  a  $8,5 \times 10^8$  cópias genômicas por grama de fezes foram detectadas pela técnica de qRT-PCR em amostras positivas para RVB. Além disso, análises filogenéticas do gene VP7 de cepas de RVB revelaram uma alta diversidade de genotipos G circulando em uma única região do Brasil. Esse estudo sugere que RVB pode ser considerado um importante patógeno primário entérico em suínos, e fornece informações sobre a caracterização de RVB, além de destacar a importância de incorporar RVB junto com outras espécies de RV na rotina de diagnóstico de doenças entéricas de suínos.

**Palavras-chave:** Diarreia. Suínos. Surtos de diarreia, RVB. Genotipo G.

MIYABE, Flavia Megumi. **Rotavirus B as primary causative agent of diarrhea in newborn piglets**. 2020. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020

## ABSTRACT

Neonatal diarrhea is one of the major health problems in pig production. Among several etiological agents involved in enteric diseases, rotavirus (RV) is considered the main causative agent of acute viral gastroenteritis in young animals. RV is a member of the *Reoviridae* family and is classified into nine species (A - I), five of which have been identified in pigs (RVA, RVB, RVC, RVE and RVH). RVA species is the most prevalent and is considered the most important and pathogenic among the RV species. However, studies conducted in the United States and Brazil have shown high frequencies of RVB in piglets with diarrhea; however, mostly in association with other RV species, such as RVA, RVC and RVH. The aim of this study was to describe the detection of porcine RVB acting as primary causative agent of diarrhea outbreaks in newborn piglets in Brazilian pig herds, as well as to determine the G genotype of these Brazilian RVB strains. Ninety samples, including 77 diarrheal fecal samples and 13 small intestinal fragments were collected during an unusual diarrhea outbreak in newborn piglets from eight pig herds from the Central-west region of Brazil. The samples were submitted to RT-PCR assay to detect viral enteric pathogens and histopathological analyses were performed on the small intestine fragments. In addition, two fecal samples were submitted to transmission electron microscopy (EM) and virus isolation in cell culture. RVB-positive samples were subjected to qRT-PCR assay to quantify the viral load, and phylogenetic analyses of the VP7 protein of selected RVB strains were performed. High frequency of RVB (71.1%, 64/90) was observed, mostly in singular infection, associated with marked histopathological lesions on the small intestines of affected piglets. RV-like particles were observed by EM in a positive RVB fecal sample. Mild to high viral loads ( $7.6 \times 10^2$  to  $8.5 \times 10^8$  genomic copies per gram of feces) were detected in RVB-positive samples. Moreover, phylogenetic analysis of the VP7 gene of these RVB strains revealed a high diversity of G genotypes circulating in a single geographic region of Brazil. This study suggests that RVB can be considered an important primary enteric pathogen in pigs, and provides new information about the characterization of RVB, as well as reinforce the importance of incorporating RVB along with other RV species into the diagnostic routine of intestinal diseases of pigs.

**Keywords:** Diarrhea. Pigs. Outbreak. RVB. G genotype.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** a) Partículas virais de RV em microscopia eletrônica; b) Ilustração simplificada da partícula viral e de seus componentes; c) Perfil de migração eletroforético dos 11 segmentos genômicos (RNAfd) de RV espécie A, B e C, com as proteínas codificadas por cada segmento..... 16

### PORCINE ROTAVIRUS B AS A PRIMARY CAUSATIVE AGENT OF DIARRHEA IN NEWBORN PIGLETS

- Figure 1** Histopathological findings in jejunum observed in newborn piglets naturally infected by RVB. A) Observed marked atrophic enteritis with villous atrophy and blunting. B) Severe atrophic enteritis with villous fusion (arrow) and hyperplasia of Peyer patches (asterisk). Hematoxylin & Eosin stain. Bar, A, B 100  $\mu$ m ..... 40

- Figure 2** Phylogenetic tree based on nucleotide sequences (700 nt) of the VP7 gene of porcine RVB strains described in this study and representative strains of the 26 previously identified RVB G genotypes. The tree was constructed using the neighbor-joining method based on the Kimura 2-parameter model. The scale bar indicates nt substitutions per site. The bootstrap values (1,000 replicates) are shown at the branch nodes (values <80% not shown). The Brazilian porcine RVB strains are marked with filled circles..... 41

- Supplementary Figure S1** Negative staining of Rotavirus-like particles in a faecal sample analysed by transmission electron microscopy. Bar, 100 nm. Magnification,  $\times 100,000$ ..... 43

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b>	Características das proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do RV .....	15
<b>Tabela 2</b>	Valores de corte de identidade de nucleotídeo dos 11 segmentos genômicos de RVB e seus respectivos genótipos .....	21

### PORCINE ROTAVIRUS B AS A PRIMARY CAUSATIVE AGENT OF DIARRHEA IN NEWBORN PIGLETS

<b>Table 1</b>	Distribution of total biological samples positives for RVB and respective viral load and G genotypes identified by pig herds and sampling .....	42
<b>Table 2</b>	Gene targets, primers and respective RT-PCR products used to identify enteric viruses in pig samples .....	43
<b>Supplementary Table S2</b>	Identity matrix of G genotypes of RVB strains described in this study and representative strains of the 26 previously identified RVB G genotypes .....	44
<b>Supplementary Table S3</b>	Accession number of the G genotypes of RVB strains used to construct the phylogenetic tree and the identity matrix. The Brazilian porcine RVB strains described in the present study are marked with filled circles.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	<i>Amino acid</i> (Aminoácido)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp / pb	<i>Base pairs</i> / Pares de base
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleosídeo-trifosfato
dsRNA	<i>Double-strand RNA</i> (Ácido ribonucleico de fita dupla)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EM	<i>Electron microscopy</i> (Microscopia eletrônica)
NSP	<i>Non structural protein</i> (Proteína não estrutural)
nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PAGE / EGPA	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> / Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEDV	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> (Vírus da diarreia epidêmica suína)
PEV	<i>Porcine enterovirus</i> (Enterovírus suíno)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	RT-PCR quantitativa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
RV	Rotavirus
RVA	Rotavirus A
RVB	Rotavirus B
RVC	Rotavirus C
RVE	Rotavirus E
RVH	Rotavirus H
SDCoV	<i>Swine Delta coronavirus</i> (Deltacoronavírus suíno)
SVV	<i>Seneca Valley Virus</i> (Senecavírus)
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (Vírus da gastroenterite transmissível suína)
VP	<i>Viral protein</i> (Proteína viral)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1	INTRODUÇÃO .....	13
1.2	DIARREIA NEONATAL SUÍNA .....	14
1.3	ROTAVIRUS .....	14
1.3.1	Taxonomia E Características Moleculares .....	15
1.3.2	Classificação .....	17
1.3.3	Rotavirose Em Suínos .....	18
1.3.4	Rotavírus B .....	19
1.3.5	Diagnóstico .....	21
1.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	23
1.5	REFERÊNCIAS .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
2.1	OBJETIVO GERAL .....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	29
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	48
	<b>ANEXOS</b> .....	49
	ANEXO A - Lista de reagentes .....	49
	ANEXO B - Soluções e Tampões .....	53
	ANEXO C - Protocolos de Técnicas .....	58
	ANEXO D - Lista de softwares .....	75

## 1.1 INTRODUÇÃO

A suinocultura representa uma atividade de grande importância econômica e social no Brasil, oferecendo um mercado promissor e atrativo para os criadores. O consumo per capita desta carne cresce a cada ano, e o Brasil destaca-se como o quarto maior produtor e exportador de carne suína no mundo, com uma produção de 3,974 milhões de toneladas no ano de 2018, que representa 3% da produção mundial. Além de gerar diversos empregos em toda a sua cadeia produtiva, envolvendo um grande número de produtores, é também responsável por garantir o abastecimento interno e movimentar a economia com as exportações (ABPA, 2019).

Embora seja uma atividade tradicional no Brasil e em outros países, novas descobertas nas áreas de genética, sanidade, nutrição e manejo têm alterado consideravelmente a suinocultura, visando não só o aumento de produtividade e qualidade da carne, mas também reduzir o impacto ambiental e garantir o bem-estar dos animais (GUIMARÃES et al., 2017).

O aumento da tecnificação e as modificações inseridas no sistema de produção de suínos acarretaram uma maior concentração dos animais, o que aumentou a predisposição ao estresse, além de facilitar a transmissão de doenças infecciosas. Os rebanhos suínos estão continuamente expostos a diversos agentes patogênicos presentes no ambiente, porém a ocorrência de doenças depende de um conjunto de fatores, relacionados principalmente ao manejo, à nutrição dos animais, ao *status* imunológico do hospedeiro e a presença concomitante de micro-organismos (ALFIERI et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2017).

O perfil epidemiológico das doenças dos suínos vem apresentando alterações em relação à etiologia. Anteriormente, as doenças bacterianas eram as que causavam maiores impactos na produção, no entanto, as doenças virais e multifatoriais, vem sendo relatadas com maiores frequências na suinocultura, apresentando altas taxas de morbidade e, mortalidade variável, além de serem responsáveis por perdas econômicas consideráveis, devido à redução no desempenho e aumento nos custos de produção (CIACCI-ZANELLA; MORÉS; BARCELLOS, 2016).

Os problemas entéricos na suinocultura apresentam-se como um desafio constante, principalmente no período neonatal, que é considerado o mais crítico na produção (ALFIERI et al., 2016). Durante esse período, a principal manifestação clínica nos leitões é a diarreia, que normalmente tem caráter enzoótico, porém pode ocorrer na forma de surtos, ocasionando altas taxas de morbidade e mortalidade (DEWEY et al., 1995).

## 1.2 DIARREIA NEONATAL SUÍNA

A diarreia neonatal é considerada mundialmente como o principal problema sanitário nessa fase de criação e caracteriza-se pelo aspecto multifatorial e multietiológico, que envolve fatores predisponentes, relacionados principalmente aos manejos zootécnico e sanitário, e fatores determinantes que incluem os micro-organismos entéricos patogênicos (ALFIERI et al., 2017; RUIZ et al., 2016).

Dentre os fatores predisponentes, destacam-se as instalações e nutrição inadequadas, falhas nos processos de limpeza e desinfecção, não assistência ao parto, entre outras falhas de manejo que contribuem para a manutenção dos sinais clínicos nos leitões. Contudo, os fatores determinantes, que envolvem uma grande variedade de micro-organismos, são responsáveis pelas infecções entéricas, com episódios de diarreia, seguidos por desidratação, desequilíbrio eletrolítico, e dependendo da intensidade, podem ocasionar refugagem e morte dos leitões (ZLOTOWSKI; DRIEMEIER; BARCELLOS, 2008).

Os leitões neonatos são susceptíveis a diversos micro-organismos entéricos, incluindo bactérias, parasitas e vírus. As infecções bacterianas mais comuns em leitões lactentes são a colibacilose, causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), e a clostridiose, causada pelo *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* tipos A e C (KONGSTED et al., 2018). Com relação às doenças parasitárias, a coccidiose (*Isospora suis*) e a criptosporidiose (*Cryptosporidium spp*) são as que apresentam maior prevalência (LIPPKE et al., 2011). Dentre os diversos gêneros de vírus, classificados em diferentes famílias, rotavírus (RV) destaca-se como um dos principais agentes da diarreia neonatal, sendo mundialmente considerado como um dos maiores causadores de doença entérica em animais jovens, incluindo suínos e humanos (MÉDICI et al., 2011; LORENZETTI et al., 2014).

## 1.3 ROTAVIRUS

Os primeiros relatos de RV datam de 1969, quando partículas virais, inicialmente denominadas de *reovirus-like*, foram identificadas em fezes de bezerros com diarreia (MEBUS et al., 1969). Alguns anos depois, Bishop e colaboradores (1973) detectaram partículas virais semelhantes em células do epitélio duodenal de crianças com gastroenterite. Devido à semelhança morfológica das partículas virais observadas por microscopia eletrônica com uma roda (*rota*, em latim), em 1974, Flewett e colaboradores propuseram a nomenclatura *Rotavirus* para os vírus encontrados. No ano seguinte, o RV foi identificado pela primeira vez na espécie

1 suína, em amostras de fezes diarreicas e conteúdo intestinal de leitões apresentando  
2 gastroenterite aguda (RODGER; CRAVEN; WILLIAMS, 1975; WOODE et al., 1975).

3

#### 4 1.3.1 Taxonomia e Características Moleculares

5

6 RV são membros da família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, possuem simetria  
7 icosaédrica, medem aproximadamente 70 nm de diâmetro e são desprovidos de envelope. O  
8 genoma viral é composto por 11 segmentos de RNA fita dupla, que codifica seis proteínas  
9 estruturais (VP – *viral protein*) e seis proteínas não estruturais (NSP – *non-structural protein*).  
10 Cada um dos segmentos genômicos codifica uma proteína, exceto pelo segmento 11 que  
11 codifica duas proteínas (NSP5 e NSP6) (ESTES; GREENBERG, 2013; CRAWFORD et al.,  
12 2017).

13 No *core* ou núcleo viral estão presentes as proteínas VP1, VP2 e VP3, que constituem  
14 a camada interna do vírus, já o capsídeo viral é formado por três camadas proteicas, sendo duas  
15 camadas externas constituídas pela VP4 e VP7, e uma camada intermediária constituída pela  
16 VP6 (ESTES; GREENBERG, 2013). As proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4,  
17 NSP5 e NSP6) apresentam funções no ciclo replicativo e na interação com proteínas do  
18 hospedeiro que influenciam na patogênese e na resposta imunológica, sendo encontradas  
19 apenas nas partículas virais maduras ou infectantes (GREENBERG; ESTES, 2009). A tabela 1  
20 descreve as funções e a localização de cada gene de RV.

21

22 **Tabela 1** – Características das proteínas codificadas pelos segmentos genômicos de RV

Gene	Proteína	Localização nas partículas	Funções
1	VP1	Nucleocapsídeo	RNA polimerase RNA-dependente
2	VP2	Nucleocapsídeo	União ao RNA; forma o nucleocapsídeo
3	VP3	Nucleocapsídeo	Guanililtransferase; metiltransferase; proteína básica
4	VP4	Camada externa do capsídeo	Proteína de ligação à célula; antígeno neutralizante P-tipo; aumenta a infectividade após clivagem, formando as proteínas VP5 e VP8*;
	VP5/VP8*	Produto da clivagem de VP4*	VP5 permeabiliza membranas

5	NSP1	Proteína não estrutural	Associa-se ao citoesqueleto
6	VP6	Camada intermediária do capsídeo	Proteína mais abundante nos vírions; antígeno de grupo/espécie
7	NSP3	Proteína não estrutural	Envolvida na regulação da tradução
8	NSP2	Proteína não estrutural	Atividade NTPase; acumula-se nos viroplasmas
9	VP7	Camada externa do capsídeo	Antígeno neutralizante G-tipo
10	NSP4	Proteína não estrutural	Enterotoxina; receptor para partículas com duplo capsídeo no retículo endoplasmático
11	NSP5	Proteína não estrutural	Possível cinase autocatalítica; interage com VP2, NSP2 e NSP6
	NSP6	Proteína não estrutural	Produto da ORF2 do gene 11; interage com NSP5; localizada em viroplasmas

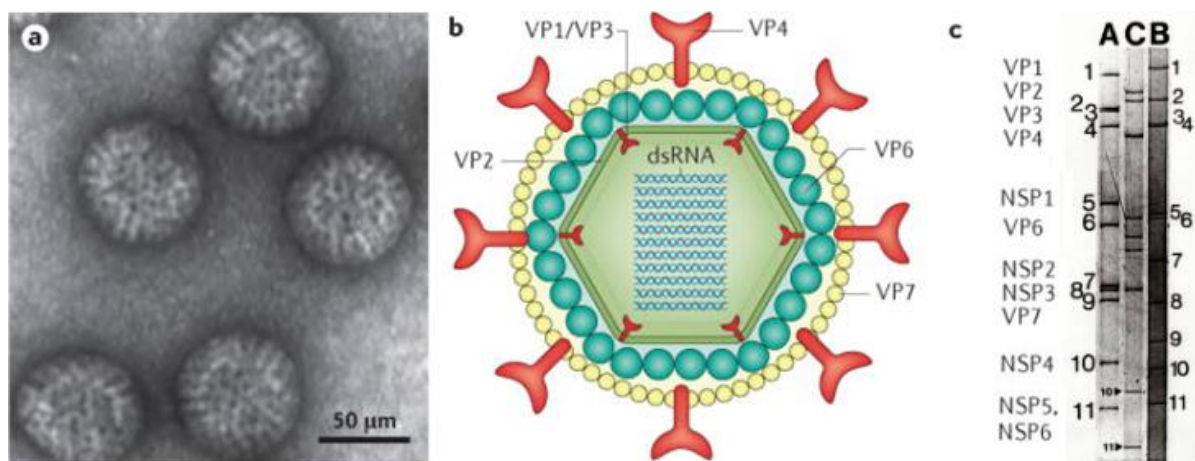
1 **Fonte:** adaptado de ALFIERI et al., 2017

2

3 O tamanho de cada um dos 11 segmentos genômicos dos RV varia de 600 a 3000 pb e  
 4 o genoma completo possui aproximadamente 18600pb (ALFIERI et al., 2017). A diferença no  
 5 tamanho de cada segmento possibilita a visualização do perfil de migração característico de  
 6 RV na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Os RV da espécie A  
 7 apresentam um perfil de migração dos segmentos representado como 4-2-3-2, os da espécie  
 8 RVB apresentam o perfil 4-2-2-3, já os da espécie RVC é representado como 4-3-2-2.  
 9 (ALFIERI et al., 2017) (Figura 1).

10

11 **Figura 1** – a) Partículas virais de RV em microscopia eletrônica; b) Ilustração simplificada da  
 12 partícula viral e de seus componentes; c) Perfil de migração eletroforético dos 11 segmentos  
 13 genômicos (RNAfd) de RV espécie A, B e C, com as proteínas codificadas por cada segmento.



1  
2 **Fonte:** Adaptado de CRAWFORD et al., 2017

### 3 4 1.3.2 Classificação

5  
6 De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2019), com base  
7 nas características antigênicas e moleculares da proteína viral VP6, RV são classificados em  
8 nove espécies (RVA – RVI). Recentemente Bányai e colaboradores (2017) propuseram a  
9 criação de uma nova espécie (RVJ), após a detecção de um novo RV em morcegos na Sérvia.

10 As espécies RVA, RVB, RVC e RVH já foram identificadas causando infecção tanto  
11 em humanos quanto em animais, enquanto as demais espécies infectam apenas animais  
12 (MATTHIJNSSENS; MARTELLA; VAN RANST, 2010; MOLINARI et al., 2016;  
13 ALEKSEEV et al., 2018). Cinco das nove espécies de RV (RVA, RVB, RVC, RVE e RVH) já  
14 foram detectadas em suínos (MÉDICI et al., 2011; MARTHALER et al., 2012; MOLINARI et  
15 al., 2016). A espécie RVA foi a primeira a ser descrita e, dentre as espécies de RV, é a que  
16 apresenta maior prevalência e patogenicidade, com vários estudos investigando sua  
17 epidemiologia e diversidade molecular (AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; SILVA et al.,  
18 2015; LORENZETTI; ALFIERI; ALFIERI, 2016).

19 RV podem ser classificados ainda em genótipos, com base nos genes que codificam as  
20 proteínas da camada externa do capsídeo, VP4 (P – protease sensível) e VP7 (G - glicoproteína)  
21 (ESTES; GREENBERG, 2013). Dessa forma, semelhante ao vírus da influenza, RV possui um  
22 sistema binário de classificação, constituído por genótipos P e G (ALFIERI et al., 2017).  
23 Devido à grande diversidade genética encontrada nas cepas de RVA, em 2008 foi proposto um  
24 novo sistema de classificação com base nos 11 segmentos do genoma viral, com a  
25 nomenclatura Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, que correspondem, respectivamente,

1 às proteínas VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5/6  
2 (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

3 Apesar de RV ser considerado, predominantemente, espécie-específico, a  
4 caracterização dos genes VP4 e VP7 permitiu a identificação de eventos de rearranjo, com  
5 diferentes combinações de P e G, e de transmissão interespécies, sugerindo a ocorrência de  
6 infecções heterólogas (MARTELLA et al., 2010).

7

### 8 1.3.3 Rotavirose em Suínos

9

10 A rotavirose em suínos é caracterizada por acometer principalmente os animais na faixa  
11 etária que corresponde ao período de declínio da imunidade passiva, que ocorre a partir da  
12 segunda semana de idade, atingindo níveis críticos entre a terceira e quinta semanas. Pode haver  
13 também um aumento considerável de infecções no período pós-desmame, devido ao estresse  
14 fisiológico e social em que os animais são submetidos (ALFIERI et al., 2016). Apesar de, em  
15 alguns casos, os animais acometidos não apresentarem sinais clínicos, a infecção por RV está  
16 amplamente disseminada nos rebanhos suinícolas brasileiros e em vários outros países onde a  
17 suinocultura é explorada de forma intensiva (MÉDICI et al., 2011; VLASOVA; AMIMO;  
18 SAIF, 2017).

19 A transmissão da rotavirose ocorre principalmente pela via fecal-oral, por meio da  
20 ingestão de água e alimentos contaminados, podendo ocorrer também a transmissão por  
21 aerossóis e contato direto (CRAWFORD et al., 2017). As principais fontes de infecção,  
22 responsáveis pela persistência do vírus no rebanho, são os animais doentes ou com infecção  
23 subclínica, uma vez que RV são excretados tanto nas fezes com consistência normal quanto  
24 diarreicas (MARTHALER, 2014). As fêmeas prenhes, quando portadoras, são consideradas  
25 uma importante fonte de infecção para os leitões, pois no período de parto sofrem alterações  
26 hormonais que ocasionam imunodepressão transitória, levando à excreção do vírus nas fezes,  
27 mesmo não apresentando sinais clínicos de diarreia (ALFIERI et al., 2016). Outro fator que  
28 contribui para a contaminação ambiental, é a grande quantidade de partículas virais ( $10^{10}$  a  
29  $10^{12}$ ) eliminadas por grama de fezes durante o período agudo da infecção. Tais partículas são  
30 altamente resistentes às condições do meio ambiente e aos desinfetantes utilizados  
31 rotineiramente, dificultado o controle da infecção nos animais suscetíveis (ALFIERI et al.,  
32 2017).

33 RV possuem tropismo por enterócitos maduros localizados nas regiões apical e  
34 intermediária das vilosidades intestinais, após a entrada do vírus nos enterócitos, a replicação

1 viral se inicia, resultando em lise das células infectadas, descamação do epitélio intestinal e  
2 consequente atrofia das vilosidades (ALFIERI et al., 2016). Com base nos mecanismos  
3 fisiopatológicos, a diarreia ocasionada por RV é conhecida como diarreia por má absorção,  
4 ocorrendo também, falha na digestão da lactose, devido à baixa concentração ou até mesmo  
5 ausência da enzima lactase, que é secretada pelos enterócitos maduros (RAMIG, 2004). Além  
6 disso, a proteína NSP4, que é uma enterotoxina, pode ocasionar diarreia por hipersecreção; esta  
7 proteína altera a permeabilidade da membrana plasmática, que determina aumento nas  
8 concentrações intracelulares de cálcio e, conseqüentemente, secreção de íons cloreto pelas  
9 células do ápice das vilosidades (VLASOVA; AMIMO; SAIF, 2017)

10 Os primeiros sinais de diarreia surgem após o período de incubação, que é de 16 a 24h.  
11 Os animais apresentam, principalmente, diarreia de consistência pastosa a líquida e de curta  
12 duração, em média de dois a três dias, no entanto, o vírus pode ser excretado nas fezes por até  
13 sete dias pós-infecção. A ocorrência de vômitos é rara e a desidratação é mais frequente em  
14 leitões muito jovens, onde a infecção tende a ser mais grave (ALFIERI et al., 2016). A  
15 morbidade da rotavirose em suínos é alta, principalmente nas primo-infecções, apresentando  
16 taxas de prevalência de até 82% nos EUA (MARTHALER et al., 2014b), porém a mortalidade,  
17 em geral, é baixa, podendo ser mais elevada em neonatos debilitados que não receberam o  
18 colostro de forma adequada (ALFIERI et al., 2016).

#### 19 20 1.3.4 Rotavírus B

21  
22 As primeiras descrições de RVB em suínos ocorreram na década de 80, quando foram  
23 identificadas, por imuno microscopia eletrônica, em fezes diarreicas de leitões, partículas virais  
24 idênticas ao RV já descrito, porém apresentando grupos antigênicos diferentes, com base em  
25 estudos com soro hiperimune de cobaias, e genoma com padrão de migração eletroforético  
26 distinto, sugerindo a classificação de RV em diferentes espécies (PEDLEY et al., 1983; THEIL  
27 et al., 1985). A infecção por RVB já foi descrita também em outras espécies animais, incluindo  
28 humanos, bovinos, ovinos, caprinos e roedores como camundongos e ratos (SUZUKI et al.,  
29 2012a; SHEPHERD et al., 2018).

30 Apesar ter sido identificado apenas alguns anos após RVA, as informações sobre a  
31 epidemiologia de RVB em suínos permanecem limitadas, sendo um dos motivos o fato de RVB  
32 não se adaptar em cultivo celular. Em 1996, foi relatado o isolamento de uma provável cepa de  
33 RVB em cultivo celular, que foi denominada SKA-1 (SANEKATA et al., 1996), porém, alguns  
34 anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores descobriu que essa cepa era, na verdade, mais

1 semelhante a espécie RVH (WAKUDA et al., 2011), não havendo até então nenhum outro  
2 relato de isolamento de RVB em cultivo celular, o que dificulta sua caracterização sorológica  
3 e molecular, e também o desenvolvimento de vacinas contra essa espécie de RV  
4 (MARTHALER et al., 2014a).

5 As infecções por RVB suíno já foram reportadas em diversos países, como África do  
6 Sul (GEYER et al., 1996), Brasil (MÉDICI et al., 2011), Japão (SUZUKI et al., 2012a), Índia  
7 (LAHON et al., 2014), Estados Unidos (MARTHALER et al., 2014b), Rússia (ALEKSEEV et  
8 al., 2018), entre outros, geralmente de forma esporádica e em associação com outras espécies  
9 de RV, não sendo considerada, até recentemente, como uma causa importante de diarreia em  
10 leitões.

11 No entanto, estudos conduzidos no Japão (KUGA et al., 2009), EUA (MARTHALER  
12 et al., 2012) e Brasil (MOLINARI et al., 2016) demonstraram altas frequências de RVB  
13 (25,9%, 46,8% e 32%, respectivamente) em rebanhos suínos com ou sem sinais de  
14 gastroenterite, tanto em infecções mistas com RVA, RVC e RVH quanto em infecções  
15 singulares, sugerindo que RVB pode ser considerado um importante agente causador de  
16 diarreia em suínos.

17 Em estudos experimentais com RVB foi possível verificar em leitões inoculados,  
18 diarreia aguda e transitória (THEIL et al., 1985; MADSON, 2013). Em animais naturalmente  
19 infectados, RVB foi identificado em quadros de doença gastroentérica tanto em leitões  
20 lactentes como em recém-desmamados e sua detecção em amostras clínicas parece aumentar  
21 conforme a idade do animal, apresentando frequências de 10 a 18% em animais com < 21 dias  
22 e frequências de 50 a 72% em animais com > 55 dias (MARTHALER et al., 2012, 2014b).  
23 Além disso, um estudo soroepidemiológico realizado no Japão, demonstrou altas prevalências  
24 de anticorpos anti-RVB em rebanhos bovinos e suínos (47% e 97%, respectivamente)  
25 utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) (TSUNEMITSU et al., 2005).

26 Sabe-se que animais infectados por RVA eliminam grandes quantidades de partículas  
27 virais por grama de fezes no período agudo da infecção, porém o mesmo parece não ocorrer  
28 nas infecções por RVB, sendo excretado em menores quantidades, o que contribui para a baixa  
29 detecção e até mesmo falhas no diagnóstico desta espécie, como descrito por Chang e  
30 colaboradores na década de 90 (CHANG et al., 1997).

31 Assim como ocorre para RVA, a espécie RVB também tem sido classificada em  
32 genótipos, no entanto, estudos sobre a caracterização molecular dessa espécie ainda são  
33 escassos, e até pouco tempo sua caracterização se limitava a apenas algumas proteínas (KUGA  
34 et al., 2009; SUZUKI et al., 2011, 2012a, 2012b; MARTHALER et al., 2012, 2014a). A

1 classificação dos genótipos G de RVB foi proposta pela primeira vez em 2009 por Kuga e  
 2 colaboradores, que analisaram o gene VP7 de cepas japonesas de RVB e, utilizando valores de  
 3 corte de identidade de nucleotídeo de 67 e 76%, estabeleceram 5 genótipos G, divididos em 12  
 4 grupos ou *clusters*. Em 2012, com base na análise de cepas de RVB dos EUA, Marthaler e  
 5 colaboradores propuseram uma modificação nos valores de ponto de corte para 80% de  
 6 identidade de nucleotídeo, estabelecendo assim 20 genótipos G de RVB. Posteriormente, com  
 7 base nesse novo valor de corte, foram descritos dois novos genótipos G de RVB, G21 e G22  
 8 (LAHON et al., 2014; MOLINARI; ALFIERI; ALFIERI, 2018). Também em 2018, Shepherd  
 9 e colaboradores descreveram o genoma completo de cepas de RVB dos EUA, atualizando e  
 10 sugerindo novos valores de corte para todos os segmentos genômicos de RVB, incluindo para  
 11 aqueles que ainda não haviam sido estabelecido (Tabela 2). De acordo com essa nova  
 12 classificação, foram definidos 26 genótipos G de RVB.

13

14 **Tabela 2** – Valores de ponto de corte de identidade de nucleotídeo dos 11 segmentos  
 15 genômicos de RVB e seus respectivos genótipos.

Segmento genômico	Genótipo	Ponto de corte de nt (%)	Genótipos na espécie suína
VP7	G	80	G4, G6-G26
VP4	P	80	P[4] e P[5]
VP6	I	81	I4 – I13
VP1	R	78	R4
VP2	C	79	C4
VP3	M	77	M4 e M5
NSP1	A	76	A6 – A8
NSP2	N	83	N5 – N10
NSP3	T	78	T4 – T6
NSP4	E	76	E4
NSP5	H	79	H4, H6 e H7

16 **Fonte:** adaptado de SHEPHERD et al., 2018.

17

### 18 1.3.5 Diagnóstico

19

20 Devido à semelhança com os sinais clínicos de infecções entéricas causadas por outros  
 21 enteropatógenos, o diagnóstico definitivo da rotavirose deve ser realizado utilizando testes  
 22 laboratoriais (ALFIERI et al., 2016). A microscopia eletrônica é eficiente na detecção do vírus,

1 uma vez que a morfologia típica do RV permite sua identificação, porém com esta técnica não  
2 é possível distinguir as diferentes espécies de RV, além de ser inviável quando o diagnóstico  
3 envolve um grande número de amostras a serem analisadas (ALFIERI et al., 2017).

4 O isolamento viral em cultivo celular, apesar de ser um método laborioso e demorado,  
5 é de extrema importância para o desenvolvimento de estudos relacionados às características  
6 antigênicas e moleculares das cepas virais e para a produção de antígenos empregados no  
7 diagnóstico e na elaboração de vacinas (ALFIERI et al., 2017). No entanto, ao contrário da  
8 espécie RVA, RVB não se adapta em cultivo celular. Por esse motivo, os ensaios  
9 imunoenzimáticos para detecção de RVB também são limitados, não existindo testes  
10 comerciais para o diagnóstico de rotavirose ocasionada por essa espécie viral (MARTHALER,  
11 2014).

12 Por apresentar o genoma segmentado, um método diagnóstico utilizado para a  
13 identificação de RV é a técnica de EGPA, seguida de impregnação por nitrato de prata (GEYER  
14 et al., 1996; MÉDICI et al., 2011; LORENZETTI et al., 2014). A análise do perfil de migração  
15 dos 11 segmentos genômicos em EGPA possibilita a definição do grupo/espécie viral  
16 infectante, devido às diferenças no padrão eletroforético de algumas espécies. Porém, RVB,  
17 RVE e RVH detectados em suínos apresentam perfil eletroforético com a mesma distribuição  
18 dos segmentos genômicos (4-2-3-2), podendo levar a resultados imprecisos, principalmente em  
19 casos de infecções mistas (envolvimento de mais de uma espécie de RV) (ALFIERI et al.,  
20 2016). Além disso, essa técnica é mais recomendada para infecções ocasionadas por RVA,  
21 onde grande quantidade de partículas virais são eliminadas nas fezes dos animais infectados,  
22 já para as infecções causadas pelo RVB, onde ocorre menor eliminação de partículas virais, o  
23 resultado da técnica pode ser falso-negativo (MÉDICI et al., 2011).

24 Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, precedida por  
25 transcrição reversa (RT-PCR), são amplamente utilizadas para detecção de infecções por RV  
26 (MÉDICI et al., 2011; MOLINARI et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018). A RT-PCR  
27 convencional apresenta ótima sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção das  
28 diferentes espécies de RV, incluindo infecções mistas, com a utilização de *primers* específicos  
29 para cada espécie viral, além de permitir a caracterização molecular da cepa viral infectante  
30 (SUZUKI et al., 2012a; MARTHALER et al., 2014a; MOLINARI; ALFIERI; ALFIERI,  
31 2018). No entanto, a RT-PCR convencional é uma técnica que demanda tempo e várias etapas  
32 de manipulação das amostras, aumentando o risco de contaminação, além de requerer etapas  
33 pós-PCR, como eletroforese em gel de agarose para visualização dos *amplicons*, fornecendo

1 apenas informações qualitativas (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; FREEMAN et al.,  
2 2008).

3 A RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) apresenta diversas vantagens em relação à RT-PCR  
4 convencional, e por isso, sua utilização na rotina diagnóstica de agentes infecciosos vem  
5 tornando-se mais frequente (MARTHALER et al., 2014b; OTTO et al., 2015). A execução da  
6 qRT-PCR é menos laboriosa, com etapas mais concentradas, e conseqüentemente, mais rápida.  
7 A técnica permite o acompanhamento dos ciclos de amplificação do produto em tempo real,  
8 não necessitando de uma etapa posterior para visualização dos *amplicons*, diminuindo  
9 consideravelmente o risco de contaminação por manipulação dos produtos amplificados (ESPY  
10 et al., 2006). A qRT-PCR é considerada mais sensível do que a RT-PCR convencional, sendo  
11 uma boa alternativa em situações em que a carga viral é baixa. Além disso, a técnica permite a  
12 estimativa da carga viral presente no processo infeccioso, sendo possível obter informações  
13 sobre o curso da infecção, inferindo se a doença está na fase aguda ou crônica, e estimar a  
14 gravidade da doença, uma vez que quanto maior a carga viral, maior é a probabilidade de que  
15 a infecção seja mais grave (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; FREEMAN et al., 2008).

16

#### 17 1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

18

19 As doenças entéricas são consideradas o principal problema sanitário em animais  
20 jovens, causando perdas econômicas consideráveis na suinocultura. Até pouco tempo atrás,  
21 RVB não era considerado um patógeno importante, sendo relatado com pouca frequência, e  
22 por isso, informações sobre sua epidemiologia em suínos ainda são limitadas, existindo poucos  
23 estudos sobre a frequência de ocorrência dessa virose entérica. Este fato reforça a necessidade  
24 de investigações mais abrangentes relativas à prevalência e diversidade genética de RVB nos  
25 rebanhos suínos brasileiros.

26 O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que possam fornecer informações mais  
27 específicas sobre o processo infeccioso dessa virose entérica, tais como aspectos relativos às  
28 interações vírus-hospedeiro, determinação da carga viral excretada nas fezes de animais  
29 infectados, e a caracterização molecular do vírus, contribuirão para um melhor entendimento  
30 da doença, visando proporcionar condutas mais eficientes de biossegurança, para o controle e  
31 profilaxia da doença, diminuindo perdas econômicas e aumentando a produtividade e bem-  
32 estar animal.

33

## 1 1.5 REFERÊNCIAS

- 2
- 3 ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal | ABPA**. Disponível em: <[http://abpa-](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial)  
4 [br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial)>. Acesso em: 14 de Janeiro de 2020.
- 5 ALEKSEEV, K. et al. Genome characterization of a pathogenic porcine rotavirus B strain  
6 identified in Buryat Republic, Russia in 2015. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 46, 2018.
- 7 ALFIERI, A. A., ALFIERI, A. F., MATOS, A.C.D., LORENZETTI, E.; LOBATO, Z. I. P.  
8 *Reoviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**.  
9 3. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2017. p.957-1003
- 10 ALFIERI, A. A., BARRY, A. F., OTONEL, R. A. A., ALFIERI, A. F. Rotavíruses. In:  
11 MEGIDE, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de**  
12 **Produção e de Companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 844-852.
- 13 ALMEIDA, P. R. et al. Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from  
14 southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical  
15 characterization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 3, p. 370–376,  
16 2018.
- 17 AMIMO, J. O.; VLASOVA, A. N.; SAIF, L. J. Detection and genetic diversity of porcine  
18 group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in  
19 Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. **Journal of Clinical**  
20 **Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1142–51, 2013.
- 21 BÁNYAI, K. et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber’s bats, Serbia. **Infection,**  
22 **Genetics and Evolution**, v. 48, p. 19–26, 2017.
- 23 BISHOP, R. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with  
24 acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281–1283, 1973.
- 25 CHANG, K. O. et al. Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves  
26 and adult cows and characterization of their VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**,  
27 v. 38, n. 8, p. 2107-2110, 1997.
- 28 CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças  
29 sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária**  
30 **Brasileira**, n. 5, p. 443–453, 2016.
- 31 CRAWFORD, S. E. et al. Rotavirus infection. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, 2017.
- 32 DEWEY, C. E. et al. Herd-and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea  
33 morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. **Swine Health and Production**, v. 3, p.  
34 8, 1995.
- 35 ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory  
36 testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165–256, 2006.
- 37 ESTES, M. K.; GREENBERG, H. B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., et al.  
38 **Fields Virology**, 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins,

- 1 p. 1347–1401, 2013.
- 2 FLEWETT, T. . et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and  
3 newborn calves. **The Lancet**, v. 304, n. 7872, p. 61–63, 1974.
- 4 FREEMAN, M. M. et al. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool  
5 using a modified real-time RT-PCR assay. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 8, p.  
6 1489–1496, 2008.
- 7 GEYER, A. et al. Group B and C porcine rotaviruses identified for the first time in South  
8 Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 67, n. 3, p. 115–6, 1996.
- 9 GREENBERG, H. B.; ESTES, M. K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination.  
10 **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939–51, 2009.
- 11 GUIMARÃES, D. et al. Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no  
12 Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDS Setorial**. v. 45, p. 85-136, 2017.
- 13 ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019. **Virus taxonomy: 2017**  
14 **release**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 12 de  
15 Setembro de 2019.
- 16 KONGSTED, H. et al. Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological  
17 findings. **Porcine Health Management**, v. 4, n. 17, 2018.
- 18 KUGA, K. et al. Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of  
19 porcine group B rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 154, n. 11, p. 1785–1795, 2009.
- 20 LAHON, A. et al. Molecular characterization of group B rotavirus circulating in pigs from  
21 India: Identification of a strain bearing a novel VP7 genotype, G21. **Veterinary**  
22 **Microbiology**, v. 174, n. 3–4, p. 342–352, 2014.
- 23 LIPPKE, R. T. et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents  
24 associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p.  
25 505–510, 2011.
- 26 LORENZETTI, E. et al. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C  
27 single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.  
28 34, n. 5, p. 391–397, 2014.
- 29 LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Isolation of an unusual G26P[13] group  
30 A rotavirus strain from piglets with diarrhea in Brazil. **Virus Genes**, v. 52, n. 4, p. 586–591,  
31 2016.
- 32 MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids**  
33 **Research**. v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.
- 34 MADSON, D. Comparative analysis: The pathogenesis of disease induced in piglets by group  
35 A, B and C rotaviruses, singularly or concurrently. **Research Report Swine Health - Iowa**  
36 **State University**. 2013. Disponível em: <[https://www.pork.org/wp-](https://www.pork.org/wp-content/uploads/2013/03/11-043-MADSON-ISU.pdf)  
37 [content/uploads/2013/03/11-043-MADSON-ISU.pdf](https://www.pork.org/wp-content/uploads/2013/03/11-043-MADSON-ISU.pdf)>. Acesso em: 20 de Maio de 2019.
- 38 MARTHALER, D. et al. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity

- 1 in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes.  
2 **Virology**, v. 433, n. 1, p. 85–96, 2012.
- 3 MARTHALER, D. et al. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and  
4 classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. **Veterinary Microbiology**, v.  
5 172, n. 3–4, p. 359–366, 2014a.
- 6 MARTHALER, D. et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and  
7 C by RT-qPCR in diagnostic samples. **Journal of Virological Methods**, v. 209, p. 30–34,  
8 2014b.
- 9 MARTHALER, D. G. **Ecology of Porcine Rotaviruses**. University of Minnesota, 2014.  
10 Disponível em: < <https://conservancy.umn.edu/handle/11299/182329> >. Acesso em: 17  
11 setembro. 2019
- 12 MATTHIJNSSENS, J. et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a  
13 common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like  
14 and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204–19, 2008.
- 15 MATTHIJNSSENS, J.; MARTELLA, V.; VAN RANST, M. Genomic evolution, host-  
16 species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. **Future Virology**, v. 5, n. 4, p.  
17 385–390, 2010.
- 18 MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; AND TWIEHAUS, M. J., Calf  
19 Diarrhea (Scours): Reproduced with a Virus from a Field Outbreak. **Historical Research**  
20 **Bulletins of the Nebraska Agricultural Experiment Station**, p.1913-1993, 1969.
- 21 MÉDICI, K. C. et al. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain  
22 reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel  
23 electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 146–150, 2011.
- 24 MOLINARI, B. L. D. et al. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by  
25 single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. **Veterinary Microbiology**, v.  
26 193, p. 125–132, 2016.
- 27 MOLINARI, B. L. D.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular characterization of a new  
28 G (VP7) genotype in group B porcine rotavirus. **Intervirology**, v. 61, n. 1, p. 42-48, 2018.
- 29 OTTO, P. H. et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals  
30 with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. **Veterinary**  
31 **Microbiology**, v. 179, n. 3–4, p. 168–176, 2015.
- 32 PEDLEY, S. et al. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens.  
33 **Journal of General Virology**, v. 64, n. 10, p. 2093–2101, 1983.
- 34 RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of**  
35 **Virology**, v. 78, n. 19, p. 10213–20, 2004.
- 36 RODGER, S. M.; CRAVEN, J. A.; WILLIAMS, I. Demonstration of reovirus-like particles  
37 in intestinal contents of piglets with diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 11,  
38 p. 536–536, 1975.

- 1 RUIZ, V. L. A. et al. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. **BMC**  
2 **Research Notes**, v. 9, n. 22, 2016.
- 3 SANEKATA, T. et al. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. **Journal of**  
4 **Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 759–761, 1996.
- 5 SHEPHERD, F. K. et al. Whole genome classification and phylogenetic analyses of rotavirus  
6 B strains from the United States. **Pathogens**, v. 7, p. 1–15, 2018.
- 7 SILVA, F. D. F. et al. Whole-genomic analysis of 12 porcine group A rotaviruses isolated  
8 from symptomatic piglets in Brazil during the years of 2012–2013. **Infection, Genetics and**  
9 **Evolution**, v. 32, p. 239–254, 2015.
- 10 SUZUKI, T. et al. Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among  
11 porcine rotaviruses of species B. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, p. 2922–2929,  
12 2011.
- 13 SUZUKI, T. et al. Sequence and phylogenetic analyses of nonstructural protein 2 genes of  
14 species B porcine rotaviruses detected in Japan during 2001–2009. **Virus Research**, v. 165, n.  
15 1, p. 46–51, 2012a.
- 16 SUZUKI, T. et al. Phylogenetic analysis of nonstructural protein 5 (NSP5) gene sequences in  
17 porcine rotavirus B strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1661–1668,  
18 2012b.
- 19 THEIL, K. W. et al. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and  
20 pathogenicity for gnotobiotic pigst. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 340–  
21 345, 1985.
- 22 TSUNEMITSU, H. et al. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of  
23 bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. **Journal of General Virology**, v.  
24 86, n. 9, p. 2569–2575, 2005.
- 25 VLASOVA, A. N.; AMIMO, J. O.; SAIF, L. J. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune  
26 responses and control strategies. **Viruses**, v. 9, n. 3, 2017.
- 27 WAKUDA, M. et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses.  
28 **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1491–1493, 2011.
- 29 WOODE, G. N. et al. The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute  
30 gastroenteritis of piglets. **Journal of Medical Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 203–209, 1975.
- 31 ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Pathogenesis of diarrhoea in  
32 pigs: models and examples. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 81–86, 2008.
- 33
- 34
- 35
- 36

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar cepas de RVB identificadas em surtos de diarreia em leitões neonatos em granjas da região centro-oeste do Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por meio da técnica de RT-PCR convencional a presença de RVB e outros vírus entéricos suínos em amostras biológicas com o objetivo de caracterizar a ocorrência de infecções singulares e/ou infecções mistas em leitões neonatos com diarreia.
- Realizar análises histopatológicas para descrição das lesões identificadas em fragmentos de intestino delgado de leitões neonatos provenientes de granjas com surtos de diarreia neonatal ocasionados por RVB.
- Realizar análises por microscopia eletrônica de transmissão em amostras fecais positivas para RVB para confirmar a presença de partículas virais semelhantes à rotavírus.
- Isolar e amplificar em células MA-104 cepas de RVB provenientes de surtos de diarreia neonatal em leitões lactentes.
- Determinar por meio da técnica de PCR quantitativa (qRT-PCR) com *TaqMan* a carga viral de RVB presente em fezes diarreicas de leitões e fragmentos de intestino provenientes de surtos de diarreia neonatal.
- Amplificar, sequenciar e realizar análises filogenéticas do gene VP7 para determinar os genótipos G de cepas de RVB selecionadas em surtos de diarreia neonatal em leitões.

1  
2**3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO****Scientific Reports: Decision on "Porcine Rotavirus B as Primary Causative Agent of Diarrhea Outbreaks in Newborn Piglets"**

SR

Scientific Reports &lt;do-not-reply@springernature.com&gt;

Seg, 19/10/2020 13:50

Para: Você



Dear Dr Miyabe,

Re: "Porcine Rotavirus B as Primary Causative Agent of Diarrhea Outbreaks in Newborn Piglets"

We are delighted to let you know that the above submission, which you co-authored, has been accepted for publication in Scientific Reports.

Please contact the corresponding author if you would like further details on this decision, including any reviewer feedback.

Thank you for choosing Scientific Reports and we look forward to publishing your article.

Kind regards,

Peer Review Advisors  
Scientific Reports

1 Artigo editado de acordo com as normas de publicação da revista *Scientific Reports*

2 Disponível em: <https://www.nature.com/srep/author-instructions/submission-guidelines>

## 3 4 **Porcine Rotavirus B as Primary Causative Agent of Diarrhea Outbreaks in** 5 **Newborn Piglets**

### 6 7 **ABSTRACT**

8 Rotavirus (RV) is considered a major cause of acute viral gastroenteritis in young animals.  
9 RV is classified into nine species, five of which have been identified in pigs. Most studies  
10 worldwide have highlighted diarrhoea outbreaks caused by RVA, which is considered the  
11 most important RV species. In the present study, we described the detection and  
12 characterization of porcine RVB as a primary causative agent of diarrhoea outbreaks in pig  
13 herds in Brazil. The study showed a high frequency (64/90; 71.1%) of RVB diagnosis in  
14 newborn piglets associated with marked histopathological lesions in the small intestines.  
15 Phylogenetic analysis of the VP7 gene of wild-type RVB strains revealed a high diversity of  
16 G genotypes circulating in one geographic region of Brazil. Our findings suggest that RVB  
17 may be considered an important primary enteric pathogen in piglets and should be included in  
18 the routine differential diagnosis of enteric diseases in piglets.  
19

### 20 **Introduction**

21 Rotaviruses (RV) are members of the *Reoviridae* family and a major cause of acute viral  
22 gastroenteritis in young animals, including piglets <sup>1</sup>. RV is a non-enveloped virus and its  
23 genome is composed of 11 segments of double-stranded RNA <sup>2</sup>. RV is classified into nine  
24 species (A - I), on the basis of the antigenic and genetic characteristics of viral protein 6  
25 (VP6) <sup>3,4</sup>. A new tentative species J has been recently identified in bats from Serbia <sup>5</sup>.  
26 Currently, five of the nine species of RV have been identified in pigs (RVA, RVB, RVC,  
27 RVE, and RVH) <sup>6</sup>.

28 RVA was the first RV species to be identified and is considered the most important  
29 RV species because of its high prevalence and pathogenicity in both humans and animals <sup>1,7</sup>.  
30 In 2008, a nucleotide sequence-based classification system for the complete genome of RVA  
31 strains was developed; this system assigned specific genotypes to each of the 11 RV genome  
32 segments according to nucleotide (nt) and amino acid (aa) percent cutoff values <sup>8,9</sup>. The  
33 Rotavirus Classification Working Group (RCWG) maintains this classification and uses the  
34 abbreviations Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx for the RV genes VP7-VP4-VP6-  
35 VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, respectively <sup>8,10</sup>.

36 Unlike RVA strains, which have been well characterized worldwide, RVB strains  
37 remain poorly characterized. In 2012, Marthaler et al <sup>11</sup> proposed a classification for G  
38 genotypes of RVB strains from the United States (USA), establishing 20 G genotypes;  
39 however, the complete genome of porcine RVB was described only recently <sup>12</sup>. Shepherd et  
40 al. <sup>12</sup> established a provisional genome-based classification for RVB, suggesting and updating  
41 nt cutoff values for all RVB gene segments. According to this newly proposed classification,  
42 26G, 5P, 13I, 5R, 5C, 5M, 8A, 10N, 6T, 4E, and 7H genotypes (VP7, VP4, VP6, VP1-VP3,  
43 NSP1-NSP5 genes, respectively) of RVB have been described, using nt cutoff values of 80%,  
44 80%, 81%, 78%, 79%, 77%, 76%, 83%, 78%, 76%, and 79%, respectively.

45 Studies conducted in the USA and Brazil have shown high frequencies of RVB in  
46 piglets with diarrhoea, mostly in association with other RV species, such as RVA and RVC  
47 <sup>6,7,11</sup>. Thus, the role of RVB as a primary pathogen remains unclear, and until recently, this

1 species was not considered a major causative agent of diarrhoea in piglets.

2 In the present study, we describe the detection of porcine RVB acting as a potential  
3 primary causative agent of neonatal diarrhoea outbreaks in several pig farms from the Central-  
4 West region of Brazil and the characterization of G genotypes of these Brazilian RVB field  
5 strains.  
6

## 7 **Results**

### 8 **PAGE and conventional RT-PCR**

9 Forty-two of the 90 (46.7%) biological samples evaluated in this study displayed typical  
10 electropherotype of RVB species on polyacrylamide gel electrophoresis assay (PAGE), while  
11 14 samples had inconclusive results. In the conventional RT-PCR assay, 64 of the 90 (71.1%)  
12 samples were positive for RVB; these corresponded to 46.2% (6/13) of the intestinal tissues  
13 and 75.3% (58/77) of the diarrheic faeces samples evaluated. Coinfections of RVB with RVA  
14 and RVH were identified, by conventional RT-PCR, in 2.22% (2/90) and 4.44% (4/90) of  
15 samples, respectively. All the following enteric viruses were negative in all samples by  
16 conventional RT-PCR: RVC, swine delta coronavirus (SDCoV), porcine epidemic diarrhoea  
17 virus (PEDV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), Seneca Valley virus (SVV), and  
18 porcine enterovirus (PEV).  
19

### 20 **Histopathology**

21 The histopathological findings from the jejunum revealed atrophic enteritis with marked  
22 villous atrophy and blunting, as well as reduced crypt depth, submucous lymphangiectasis,  
23 and hyperplasia of Peyer patches (Figure 1).  
24

### 25 **Transmission electron microscopy**

26 The electron microscopy (EM) examination of a faecal sample revealed the presence of  
27 wheel-shaped viruses of approximately 70 nm, similar to RV-like particles (Supplementary  
28 Figure S1).  
29

### 30 **Virus isolation**

31 Attempts at virus isolation from cell culture were performed using the same faecal sample  
32 that was analysed by EM; however, after nine blind passages in monolayer of MA-104  
33 (African green monkey kidney) cells, no cytopathic effect (CPE) was visualized. Moreover,  
34 aliquots of all passages tested negative for RVB and other RV species (RVA, RVC and  
35 RVH), as well as SDCoV, PEDV, TGEV, SVV, and PEV in the RT-PCR assay.  
36

### 37 **Real-time reverse transcription PCR assay (qRT-PCR)**

38 The qRT-PCR assay developed in this study for quantification of RVB RNA in piglet faecal  
39 samples had a limit of detection (LOD) of 13.4 genomic copies/ $\mu$ L. The viral loads in  
40 diarrheic faecal samples varied from  $7.6 \times 10^2$  to  $8.5 \times 10^8$  genomic copies/g of faeces. The  
41 mean viral loads of the RVB-positive samples are described in terms of pig herd and  
42 sampling in Table 1. In pig herds A and B, the RVB viral load shed in the faeces of diarrheic  
43 piglets seems to have a cyclic pattern, with high and low viral loads observed in the four  
44 samplings during the outbreak.  
45

### 46 **Sequencing and phylogenetic analysis**

47 Comparative sequence analysis of the VP7 gene of 16 RVB field strains found in this study  
48 and the 26 known G genotypes of RVB<sup>12</sup> revealed that at least four different G genotypes  
49 (G12, G14, G16, and G20) were circulating in these outbreaks.

1 The GO-949, GO-951, GO-1099, and GO-1113 strains displayed higher (77.1 to  
 2 80.4%) nt identity with other G12 strains; the GO-936 strain displayed 80 to 84.4% nt  
 3 identity with the G14 strains; and the GO-992 strain displayed 81.3 to 85.4% nt identity with  
 4 the G20 strains. Last, the GO-908, GO-923, GO-968, GO-970, GO-983, GO-1045, GO-1053,  
 5 GO-1119, GO-1123, and GO-1127 strains showed higher (81.5 to 83.9%) nt identity with the  
 6 G16 strains, which was the most prevalent G genotype found in this study (Supplementary  
 7 Table S2 shows the identity matrix of RVB strains described in this study and representative  
 8 strains of the 26 previously identified RVB G genotypes <sup>12</sup>).

9 In the phylogenetic tree (Figure 2), the G16 RVB Brazilian field strains clustered in a  
 10 different branch in comparison with other G16 strains; however, using the nt cutoff value of  
 11 80%, the sequence identity matrix revealed that the strains belong to the same G genotype.  
 12 Comparison among the Brazilian G12 strains showed that the strains share 85.4 - 99.8% nt  
 13 identity, while the strains belonging to the G16 genotype shared high (96.6 to 100%) nt  
 14 identity.

15 As the outbreaks occurred over a period of one year, some samples collected from pig  
 16 herds were from different peaks of diarrhoea episodes, and it was possible to longitudinally  
 17 analyse these RVB strains. Two different G genotypes were found circulating in pig herds C  
 18 and D over the sampling period. In pig herd C, the genotype G16 was detected in the first  
 19 samplings, while in the last sampling, the G12 genotype was identified. Alternatively, in pig  
 20 herd D, the genotype G14 was identified in the first samplings, while the genotype G16 was  
 21 detected in the last samplings (Table 1).

## 23 Discussion

24 Although RVA has been reported as the most prevalent RV species in both humans and  
 25 animals, porcine RVB was previously described in several regions worldwide, but usually in  
 26 sporadic cases <sup>13-15</sup>. Studies conducted in Japan, the USA, and Brazil have shown porcine  
 27 RVB frequencies of 25.9%, 46.8%, and 32%, respectively <sup>6,11,16</sup>. However, in these previous  
 28 reports, RVB was detected mostly in association with other RV species, such as RVA, RVC,  
 29 and RVH. In the present study, we detected porcine RVB in more than 70% (64/90) of the  
 30 diarrhetic faeces/ intestine tissues, with the highest RVB frequency reported thus far. In  
 31 addition, most (58/90; 64.4%) of the diarrhetic faecal samples were positive only for RVB,  
 32 and coinfections with other RV species were detected in only 6 (6.7%) faecal samples.  
 33 Furthermore, other important enteric viruses (RVC, SDCoV, PEDV, TGEV, SVV, and PEV)  
 34 were not detected in these samples, and diarrhoea outbreaks were unresponsive to treatment  
 35 with wide-spectrum antibiotics.

36 The high mortality rate observed in the outbreaks reported in this study suggests the  
 37 involvement of pathogenic RVB field strains. The marked villous atrophy observed in the  
 38 small intestines of affected piglets resulted in acute malabsorption and diarrhoea, which may  
 39 have led to the high mortality of piglets. Infections caused by SVV and TGEV may produce  
 40 similar lesions in the intestines of affected pigs <sup>17-19</sup>. Nevertheless, in this study, these viral  
 41 disease pathogens were not identified by RT-PCR. It must be highlighted that RV replicates  
 42 predominantly in the cytoplasm of villous enterocytes of the jejunum and ileum and induces  
 43 cell lysis, villous blunting and atrophy, as observed by histopathology. Severe lesions are  
 44 mostly associated with the RVA and RVC species <sup>20,21</sup>; however, our results suggest that  
 45 RVB may also induce marked lesions in the small intestine of affected piglets and can be  
 46 considered an important enteric pathogen in pigs, acting as a primary aetiologic agent of  
 47 neonatal diarrhoea outbreaks.

48 Kuga et al. <sup>16</sup> and Marthaler et al. <sup>11</sup> observed the highest frequencies of RVB in  
 49 animals > 55 days of age or fattening pigs, implying that RVB detection in clinical samples  
 50 appears to increase with age. On the other hand, Alekseev et al. <sup>22</sup> detected RVB causing a

1 diarrhoea outbreak in suckling piglets with 3 to 5 days of age in Russia, corroborating our  
2 results. The diarrhoea outbreaks described in our study affected only piglets < 20 days of age,  
3 mostly newborn piglets, suggesting that RVB can be highly detected in all age groups.

4 Some authors have suggested that the immune pressure induced by mass vaccination  
5 against RVA may have driven the selection and emergence of other RV species, such as RVB  
6 and RVC<sup>23,24</sup>. The high frequency of RVB found in this study contributes to this hypothesis  
7 since the sows of all pig herds described in this study were routinely vaccinated against  
8 enteric pathogens, including RVA. Molinari et al.<sup>6</sup> reported similar findings describing the  
9 detection of multiple RV groups in single and mixed infections in an unusual post-weaning  
10 porcine diarrhoea outbreak in a pig herd vaccinated with the RVA OSU strain in Brazil.

11 It is known that RVA species are shed in large quantities in stools of infected  
12 animals during episodes of diarrhoea, with viral loads of approximately  $10^{12}$  viral particles  
13 per gram of faeces<sup>25</sup>. In this study, the RVB viral load found was up to  $8.5 \times 10^8$  genomic  
14 copies/g of faeces, suggesting that lower quantities of RVB are shed during the acute period  
15 of infection compared to RVA. However, few virions are needed to cause disease in  
16 susceptible animals<sup>4</sup> and the transmission of RV infection occurs predominantly by the  
17 faecal-oral route, suggesting that environmental contamination contributed to the various  
18 outbreaks that occurred during the total outbreak period described in the present study.

19 The low prevalence of RVB reported worldwide may not be a consequence of a low  
20 infection rate but rather due to diagnostic gaps<sup>26</sup>. Some techniques, such as ssPAGE and EM,  
21 have low sensitivity, presenting an LOD of approximately  $10^6$  particles/mL<sup>27</sup>. In this study,  
22 the prevalence of RVB found by conventional RT-PCR was higher than by ssPAGE.  
23 Moreover, the viral loads found in this study varied from  $7.6 \times 10^2$  to  $8.5 \times 10^8$  genomic  
24 copies/g of faeces, and most of the positive samples on ssPAGE presented viral loads above  
25  $10^6$  genomic copies/g of faeces (data not shown). Therefore, the use of more sensitive  
26 diagnostic techniques is necessary to avoid false-negative results. Molecular techniques, such  
27 as RT-PCR and qRT-PCR, usually present high sensitivity and are suitable assays to detect  
28 RVB from porcine biological samples<sup>6,7,23</sup>.

29 Unlike RVA, RVB does not adapt and propagate in cell culture, which has hindered  
30 its serological and molecular characterization, as well as the development of vaccines against  
31 RVB disease. In 1996, the isolation of a putative RVB strain in cultured cells, designated the  
32 SKA-1 strain, was reported<sup>28</sup>. However, some years later, the same research group found that  
33 this strain was actually more closely related to RVH<sup>29</sup>. In this study, our attempts to isolate  
34 RVB in cell culture were unsuccessful. Nevertheless, by EM, we identified RV-like particles  
35 in the same sample that was submitted for virus isolation in cell culture. Electron microscopy  
36 lacks specificity because it cannot differentiate among RV species<sup>2</sup>; however, the submitted  
37 sample tested negative in the RT-PCR for all RV species and other viral agents, except for  
38 RVB, suggesting that the virus identified was probably RVB. In addition, the VP7 protein of  
39 this RVB strain was amplified, and we could determine its G genotype (G20).

40 Until recently, information regarding the genome of porcine RVB strains was  
41 restricted to only a few proteins<sup>11,16,30-33</sup>. The classification for G genotypes was first  
42 proposed by Kuga et al.<sup>16</sup>, who analysed the VP7 gene of Japanese RVB strains. Using nt  
43 cutoff values of 67 and 76%, the authors established five G genotypes, divided into 12  
44 clusters<sup>16</sup>. After that, based on the analysis of RVB strains from the USA, Marthaler et al.<sup>11</sup>  
45 proposed a modification of the nt cutoff value to 80%, establishing twenty G genotypes.  
46 Based on this new cutoff value, Lahon et al.<sup>14</sup> and Molinari et al.<sup>34</sup> each described new RVB  
47 G genotypes, G21 and G22, respectively. More recently, Shepherd et al.<sup>12</sup> described the  
48 whole genome of USA RVB strains, suggesting and updating cutoff values for all RVB gene  
49 segments, including those that had not been established yet. According to this most recent  
50 classification, twenty-six G genotypes for RVB were defined. In addition, the previously  
51 reported Brazilian G22 strain<sup>34</sup> was reclassified into the G24 genotype.

1 Only two VP7 RVB strains have been described in Brazil thus far, BR31 (G14) and  
2 BR62 (G24)<sup>6,34</sup>. In this study, we report 16 new Brazilian VP7 RVB wild-type strains. The  
3 phylogenetic analysis performed with the complete VP7 gene of the RVB strains identified in  
4 this study revealed that four different G genotypes were circulating in the same Brazilian  
5 geographic region (Central-West). The G16 genotype was the most prevalent, followed by  
6 the G12, G20, and G14 genotypes. Marthaler et al.<sup>11</sup> also reported G16 as the most prevalent  
7 G genotype in RVB field strains in the USA.

8 Interestingly, in the two pig herds from which we performed longitudinal  
9 phylogenetic analysis, two different G genotypes were detected over the sampling period. In  
10 pig herd C, the G16 genotype was detected within the first to third samplings, while in the  
11 fourth sampling, which occurred eight months later, the G12 genotype was found. Similarly,  
12 in pig herd D, the genotype found in the first sampling was G14, and the G16 genotype was  
13 found circulating in the same herd ten months later. These findings suggest a high variation in  
14 G genotypes circulating in Brazil.

15 RVB appears to be more diverse than RVA and RVC when considering the number  
16 of genotypes in swine hosts. According to Shepherd et al.<sup>12</sup>, 17 G genotypes of RVB have  
17 been identified in pigs compared with 12 and 15 G genotypes of RVA and RVC,  
18 respectively. Some authors even suggested that swine species might be the original natural  
19 host of RVB, strongly contributing to the genetic diversity of this RV species<sup>16,35</sup>.

20 Since RVB has been identified as an important enteric pathogen of pigs, it is  
21 essential to incorporate screening for RVB along with RVA and RVC in the diagnostic  
22 routine of swine enteric diseases. More information about the epidemiology of porcine RVB  
23 is needed to better understand its pathogenicity and prevent RVB infections, since to date  
24 there are no vaccines available for this RV species.  
25

## 26 Conclusion

27 This study reports RVB as the primary causative agent of neonatal diarrhoea outbreaks in  
28 newborn piglets. RVB was associated with marked villous atrophy and blunting in the  
29 jejunum of affected piglets, inducing malabsorptive diarrhoea and leading to high mortality  
30 rates. We suggest that the reported repeated outbreaks in these pig herds were associated with  
31 environmental contamination since we found mild to high genomic copies of RVB in piglet  
32 faeces. Additionally, the rates of RVB diagnosis in diarrhoea outbreaks reported in this study  
33 were much higher than those described in previous studies, mainly in single infections.  
34 Moreover, the variety of G genotypes identified in these outbreaks suggests that genetic  
35 diversity among porcine RVB field strains may be underestimated. Further studies are  
36 necessary to investigate the prevalence of RVB in other regions of Brazil and in other  
37 countries, as well as to identify the genotypes circulating worldwide.  
38

## 39 Materials and methods

### 40 Herds and samples

41 Neonatal diarrhoea outbreaks occurred from July 2017 to August 2018 in piglet production  
42 units from eight pig herds located in a single state of the Central-West region of Brazil. The  
43 all-in-all-out production system was used for all the pig herds, and good nutritional and  
44 health management practices were used, including the addition of vitamin and probiotic  
45 supplements and heat placement for newborn piglets. All sows were vaccinated with a  
46 commercial vaccine containing the RVA OSU (G5P[7]) strain, *Escherichia coli* (K88, K99,  
47 F41 and 987P) and *Clostridium perfringens* types C and D, following the manufacturer's  
48 recommendations. Nevertheless, the outbreaks were unresponsive to wide-spectrum antibiotic  
49 therapy, exhibiting high mortality (10 to 50%) and morbidity (35 to 50%) rates. Piglets up to

1 20 days of age, mostly newborn piglets, from all herds were affected and exhibited  
2 dehydration and watery diarrhoea, with the onset of symptoms usually at one day after birth.

3 For four of the eight pig herds affected by the diarrhoea outbreak, four or five  
4 sampling were collected at different times, with one to eight months between each sampling,  
5 enabling us to perform a longitudinal analysis of these herds.

6 A total of 90 biological samples, including 77 diarrheic faeces and 13 fragments of  
7 the small intestines from suckling piglets (1 to 20 days of age), were subjected to analysis for  
8 the identification of enteric viruses. All intestinal fragments were immersed in 10% buffered  
9 formalin solution and then routinely processed for histopathologic evaluation with  
10 haematoxylin and eosin (H&E) staining.

### 11 **Nucleic acid extraction, PAGE, and conventional RT-PCR**

12 The nucleic acid was extracted from 10% faecal/intestine suspensions in phosphate-buffered  
13 saline (PBS), pH 7.2, using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)  
14 and silica/guanidine isothiocyanate methods, described by Alfieri et al <sup>36</sup>. The nucleic acid  
15 was eluted in 50 µL of UltraPure DEPC-treated water (Invitrogen Life Technologies,  
16 Carlsbad, CA, USA) and stored at -80°C until further use. Aliquots of ultrapure sterile water  
17 were included in all nucleic acid extraction and the following procedures as negative controls.

18 All the samples were tested by PAGE assay to verify the presence of RV <sup>13</sup>. The  
19 extracted nucleic acid was also subjected to conventional RT-PCR assay to investigate and  
20 confirm the presence of RV species A, B, C, and H, as well as other porcine enteric viruses,  
21 such as SDCoV, PEDV, TGEV, SVV, and PEV. The gene targets and the RT-PCR products  
22 of each virus are described in Table 2. The amplified products were analysed by 2% agarose  
23 gel electrophoresis in TBE buffer; the gels were stained with 0.5 µg/mL of ethidium bromide  
24 and visualized under ultraviolet light.

### 25 **Transmission electron microscopy**

26 Two faecal samples positive for RVB in the RT-PCR assay were subjected to EM  
27 examination. The 10% (w/v) faecal suspensions in PBS solution were clarified by  
28 centrifugation at 1500 x g for 30 min. Then, a 5 µL drop of each sample was applied onto a  
29 300-mesh formvar-coated cooper grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)  
30 and negatively stained with 3% phosphotungstic acid for 90 s. Grids were prepared in  
31 duplicate and examined at 80 kV with a Tecnai-G2 transmission electron microscope (FEI  
32 Company, Eindhoven, The Netherlands).

### 33 **Virus isolation**

34 Attempts at virus isolation from two RVB-positive faecal samples in the RT-PCR assay were  
35 performed in a monolayer of MA-104 cells, which were grown in Dulbecco's Modified  
36 Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10%  
37 foetal calf serum (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA).

38 The inoculum was prepared as follows. A 10% (w/v) faecal suspension in PBS  
39 solution was pretreated with 3x penicillin, streptomycin, and fungizone (Gibco Antibiotic-  
40 Antimycotic, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 24 h. Then, the  
41 suspension was supplemented with 10 µg/mL trypsin and incubated at 37°C for 30 min.  
42 Before inoculation, the confluent monolayer cells were washed 2-3 times with serum-free  
43 DMEM. Then, 1 mL of the treated suspension was inoculated onto the cell monolayer. The  
44 inoculum was allowed to adsorb at 37°C for 3 h in a temperature-controlled rocker platform.  
45 The inoculated MA-104 cells were maintained with serum-free DMEM supplemented with  
46 0.5 µg/mL trypsin in a CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, USA)  
47 and inspected daily for CPE.

## qRT-PCR assay

All RVB-positive samples in the RT-PCR assay from these outbreaks were subjected to qRT-PCR assay to quantify the corresponding viral load. The qRT-PCR assay was developed in this study to quantify RVB RNA in biological samples.

The primers qRVB1174-Fw (5'-TGTTAGTATCCGCATTTGCTG-3') and qRVB1269-Rv (5'-GGGTTTTATTGCTTATTTTTTCG-3') were designed to amplify a 95 bp fragment of a specific region of the porcine RVB VP6 gene. The probe was defined as qRVB1206-pb (5'-FAM-TCCGGCGTCAGCTCCCAAAGG-MGB-3') (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The qRT-PCR assay was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The qRT-PCR master mix was prepared following the manufacturer's instructions with a final volume of 25  $\mu$ L, including 50 nM Rox Reference Dye, 400 nM each forward and reverse primer, 200 nM probe and 5  $\mu$ L of genomic template. All the samples were tested in triplicate. The cycling conditions included reverse transcription for 15 min at 50°C, *Taq* activation for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, and 30 s at 60°C. Sterile ultrapure water was used as a negative control in all reactions.

The number of genome copies present in the RVB-positive samples was estimated by comparing the sample cycle threshold ( $C_t$ ) value to standard curves. To generate the standard curves, a 95 bp-RVB VP6 fragment was cloned into the pCR 4-TOPO vector (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and ligation products were transformed into TOP10 competent *E. coli*. After transformation, *E. coli* insert-containing cultures were extracted and purified by PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and then quantified by Qubit Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA). Tenfold serial dilutions of the RVB VP6 clone containing  $1.34 \times 10^7$  to  $1.34 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L were used to generate the standard curve and to estimate the LOD of the qRT-PCR assay. The final concentration in the samples was adjusted based on the volume of nucleic acids used and was expressed per gram of faeces/intestine tissue.

## Sequencing and phylogenetic analysis

To identify the G genotypes of the porcine RVB strains, a VP7-specific RT-PCR was carried out as described by Kuga et al.<sup>16</sup>. Sixteen RVB-positive faecal samples were selected for sequence analysis, and at least one RVB field strain was chosen from each pig herd. The RT-PCR products of approximately 800 bp were purified using the PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified with a Qubit Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced using an ABI 3500 Genetic Analyser with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequence quality analyses and consensus were conducted using Phred and CAP3 software (<https://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the VP7 gene of porcine RVB strains described in this study and representative strains of the 26 previously identified RVB G genotypes<sup>12</sup> was created using the neighbour-joining method based on the Kimura two-parameter model, which provided statistical support by bootstrapping with 1,000 replicates in MEGA 7 software<sup>37</sup>. BioEdit software, version 7.2.5, was used to construct the sequence identity matrix<sup>38</sup>. The nt cutoff value used to classify the RVB strains into G genotypes was 80%, as

1 suggested by Shepherd et al. <sup>12</sup> (accession numbers of all RVB G genotype strains used to  
 2 construct the phylogenetic tree and the identity matrix can be found as Supplementary Table  
 3 S3 online).

#### 5 **Nucleotide sequences accession numbers**

6 The nucleotide sequences described in this study were deposited in the GenBank database  
 7 under the following accession numbers: MN540126 to MN540141.

#### 9 **Ethical approval**

10 This study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the  
 11 Universidade Estadual de Londrina and approved under the identification number  
 12 11363.2015.16. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the  
 13 care and use of animals were followed.

#### 15 **References**

- 16 1. Martella, V., Bányai, K., Matthijssens, J., Buonavoglia, C. & Ciarlet, M. Zoonotic  
 17 aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* **140**, 246–255 (2010).
- 18 2. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. 2013. In: Knipe D.M., Howley P.M., et al.,  
 19 eds. *Fields Virology*. 6<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams  
 20 & Wilkins, 1347-1401.
- 21 3. Matthijssens, J. *et al.* VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus  
 22 species demarcation. *Arch. Virol.* **157**, 1177–1182 (2012).
- 23 4. Crawford, S. E. *et al.* Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17083 (2017).
- 24 5. Bányai, K. *et al.* Candidate new rotavirus species in Schreiber’s bats, Serbia. *Infect.*  
 25 *Genet. Evol.* **48**, 19–26 (2017).
- 26 6. Molinari, B. L. D., Possatti, F., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Unusual  
 27 outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of  
 28 rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet. Microbiol.* **193**, 125–132 (2016).
- 29 7. Marthaler, D. *et al.* Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and  
 30 C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J. Virol. Methods* **209**, 30–34 (2014).
- 31 8. Rotavirus Classification Working Group: RCWG – Laboratory of Viral  
 32 Metagenomics. Available at: [https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-](https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg)  
 33 [classification/rcwg](https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg). (Accessed: 1st October 2020).
- 34 9. Matthijssens, J. *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a  
 35 common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-  
 36 1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* **82**, 3204–19 (2008).
- 37 10. Matthijssens, J. *et al.* Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the  
 38 Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* **156**, 1397–1413 (2011).
- 39 11. Marthaler, D. *et al.* Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity  
 40 in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes.  
 41 *Virology* **433**, 85–96 (2012).
- 42 12. Shepherd, F. K. *et al.* Whole Genome Classification and Phylogenetic Analyses of  
 43 Rotavirus B strains from the United States. *Pathogens* **7**, 1–15 (2018).
- 44 13. Médici, K. C., Barry, A. F., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Porcine rotavirus groups A,  
 45 B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with  
 46 inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Swine Heal. Prod.* —  
 47 *May J Swine Heal. Prod* **19**, 146–150 (2011).
- 48 14. Lahon, A., Ingle, V. C., Birade, H. S., Raut, C. G. & Chitambar, S. D. Molecular  
 49 characterization of group B rotavirus circulating in pigs from India: Identification of a  
 50 strain bearing a novel VP7 genotype, G21. *Vet. Microbiol.* **174**, 342–352 (2014).

- 1 15. Otto, P. H. *et al.* Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian  
2 animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet.*  
3 *Microbiol.* **179**, 168–176 (2015).
- 4 16. Kuga, K. *et al.* Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein  
5 VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch. Virol.* **154**, 1785–1795 (2009).
- 6 17. Leme, R. A., Oliveira, T. E. S., Alfieri, A. F., Headley, S. A. & Alfieri, A. A.  
7 Pathological, Immunohistochemical and Molecular Findings Associated with  
8 Senecavirus A-Induced Lesions in Neonatal Piglets. *J. Comp. Pathol.* **155**, 145–155  
9 (2016).
- 10 18. Xia, L., Yang, Y., Wang, J., Jing, Y. & Yang, Q. Impact of TGEV infection on the pig  
11 small intestine. *Virol. J.* **15**, 102 (2018).
- 12 19. Oliveira, T. E. S. *et al.* Histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural  
13 evidence of spontaneous Senecavirus A-induced lesions at the choroid plexus of  
14 newborn piglets. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
- 15 20. Ramig, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* **78**,  
16 10213–20 (2004).
- 17 21. Chang, K.-O., Saif, L. J. & Kim, Y. Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses). 2012.  
18 In: Zimmerman, J.J., *et al.*, eds. *Diseases of swines*. 10<sup>th</sup> ed. Ames: Wiley/Blackwell,  
19 621–634.
- 20 22. Alekseev, K. *et al.* Genome Characterization of a Pathogenic Porcine Rotavirus B  
21 Strain Identified in Buryat Republic, Russia in 2015. *Pathogens* **7**, 46 (2018).
- 22 23. Lorenzetti, E. *et al.* Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C  
23 single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesqui. Veterinária Bras.* **34**,  
24 391–397 (2014).
- 25 24. Possatti, F., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Genetic heterogeneity of the  
26 VP6 gene and predominance of G6P[5] genotypes of Brazilian porcine rotavirus C  
27 field strains. *Arch. Virol.* **161**, 1061–1067 (2016).
- 28 25. Flewett, T. H. Rotavirus in the home and hospital nursery. *British Medical Journal*  
29 **287**, 568–569 (1983).
- 30 26. Simpson, R., Aliyu, S., Iturriza-Gómara, M., Desselberger, U. & Gray, J. Infantile  
31 viral gastroenteritis: On the way to closing the diagnostic gap. *J. Med. Virol.* **70**, 258–  
32 262 (2003).
- 33 27. Ibrahim, O. S., Sunderland, D. & Hart, C. A. Comparison of four methods for  
34 detection of rotavirus in faeces. *Trop. Doct.* **20**, 30–32 (1990).
- 35 28. Sanekata, T. *et al.* Isolation of Group B Porcine Rotavirus in Cell Culture. *J. Clin.*  
36 *Microbiol.* **34**, 759–761 (1996).
- 37 29. Wakuda, M. *et al.* Porcine rotavirus closely related to novel group of human  
38 rotaviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1491–1493 (2011).
- 39 30. Suzuki, T., Kuga, K., Miyazaki, A. & Tsunemitsu, H. Genetic divergence and  
40 classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B. *J.*  
41 *Gen. Virol.* **92**, 2922–2929 (2011).
- 42 31. Suzuki, T., Soma, J., Miyazaki, A. & Tsunemitsu, H. Phylogenetic analysis of  
43 nonstructural protein 5 (NSP5) gene sequences in porcine rotavirus B strains. *Infect.*  
44 *Genet. Evol.* **12**, 1661–1668 (2012).
- 45 32. Suzuki, T., Soma, J., Kuga, K., Miyazaki, A. & Tsunemitsu, H. Sequence and  
46 phylogenetic analyses of nonstructural protein 2 genes of species B porcine rotaviruses  
47 detected in Japan during 2001–2009. *Virus Res.* **165**, 46–51 (2012).
- 48 33. Marthaler, D. *et al.* VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and  
49 classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* **172**, 359–  
50 366 (2014).
- 51 34. Molinari, B. L. D., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Molecular Characterization of a New

- 1 G ( VP7 ) Genotype in Group B Porcine Rotavirus. *Intervirology* **61**, 42–48 (2018).
- 2 35. Marthaler, D. *et al.* Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine  
3 group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology* **446**,  
4 189–198 (2013).
- 5 36. Alfieri, A. A., Parazzi, M. E., Takiuchi, E., Médici, K. C. & Alfieri, A. F. Frequency  
6 of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop.*  
7 *Anim. Health Prod.* **38**, 521–526 (2006).
- 8 37. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. & Dudley, J. MEGA7: Molecular Evolutionary  
9 Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874  
10 (2016).
- 11 38. Hall, T. A. BioEdit: A user–friendly biological sequence alignment editor and analysis  
12 program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 95–98 (1999). Available at:  
13 [https://www.scienceopen.com/document?vid=8b59b929-3c37-49f6-936b-](https://www.scienceopen.com/document?vid=8b59b929-3c37-49f6-936b-f8bf6dd92ace)  
14 [f8bf6dd92ace](https://www.scienceopen.com/document?vid=8b59b929-3c37-49f6-936b-f8bf6dd92ace). (Accessed: 7th July 2020)
- 15 39. Gentsch, J. R. *et al.* Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase  
16 chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1365–73 (1992).
- 17 40. Gouvea, V. *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus  
18 nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 276–82 (1990).
- 19 41. Gouvea, V. *et al.* Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain  
20 reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 519–23 (1991).
- 21 42. Alfieri, A. A. *et al.* Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus  
22 by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled  
23 oligonucleotide probes. *J. Virol. Methods* **83**, 35–43 (1999).
- 24 43. Molinari, B. L. D., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Genetic variability of VP6, VP7,  
25 VP4, and NSP4 genes of porcine rotavirus group H detected in Brazil. *Virus Res.* **197**,  
26 48–53 (2015).
- 27 44. Wang, L., Byrum, B. & Zhang, Y. Detection and genetic characterization of  
28 deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1227–30 (2014).
- 29 45. Kim, S. Y., Song, D. S. & Park, B. K. Differential detection of transmissible  
30 gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet.*  
31 *Diagnostic Investig.* **13**, 516–520 (2001).
- 32 46. Feronato, C. *et al.* Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus  
33 A diagnosis. *Trop. Anim. Health Prod.* **50**, 337–344 (2018).
- 34 47. Krumbholz, A. *et al.* Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by  
35 LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods* **113**, 51–63 (2003).
- 36  
37

### 38 Acknowledgments

39 This study was supported by the following Brazilian institutions: The National Council for  
40 Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of  
41 Higher Education Personnel (CAPES), and the Araucaria Foundation (FAP/ PR). Alfieri,  
42 A.A., Alfieri, A.F., Headley, S.A, Oliveira, T.E.S, and Miyabe, F.M. are recipients of CNPq  
43 fellowships. A.M. Dall Agnol is recipient of INCT-Leite/CAPES fellowship (grant number  
44 88887.495081/2020-00).

45

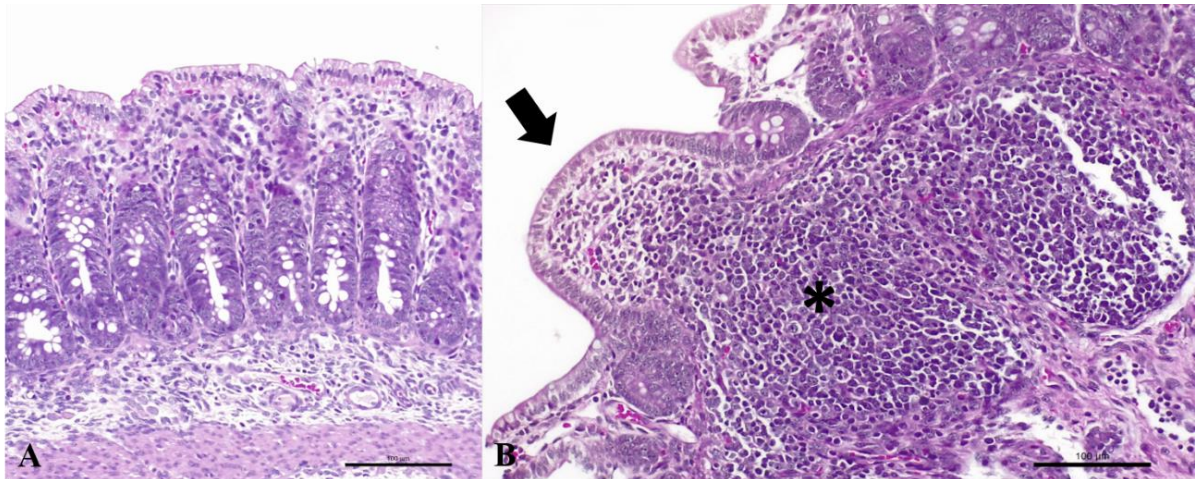
### 46 Author Contributions

47 Miyabe, F.M., Leme, R.A, and Alfieri, A.A. contributed to the conception and design of the  
48 study, the analysis and interpretation of all virological and molecular data. Miyabe, F.M.  
49 wrote the manuscript. Leme, R.A, Dall Agnol, A.M., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A.  
50 contributed to the acquisition of all samples and review of the manuscript. Oliveira, T.E.S.

1 and Headley, S.A. contributed to the preparation, evaluation and analyses of the  
2 histopathological data. Fernandes, T., and Oliveira, A.G. contributed to the preparation,  
3 evaluation, and analyses of EM data. All authors have read, critically analysed and approved  
4 the final draft of this manuscript.

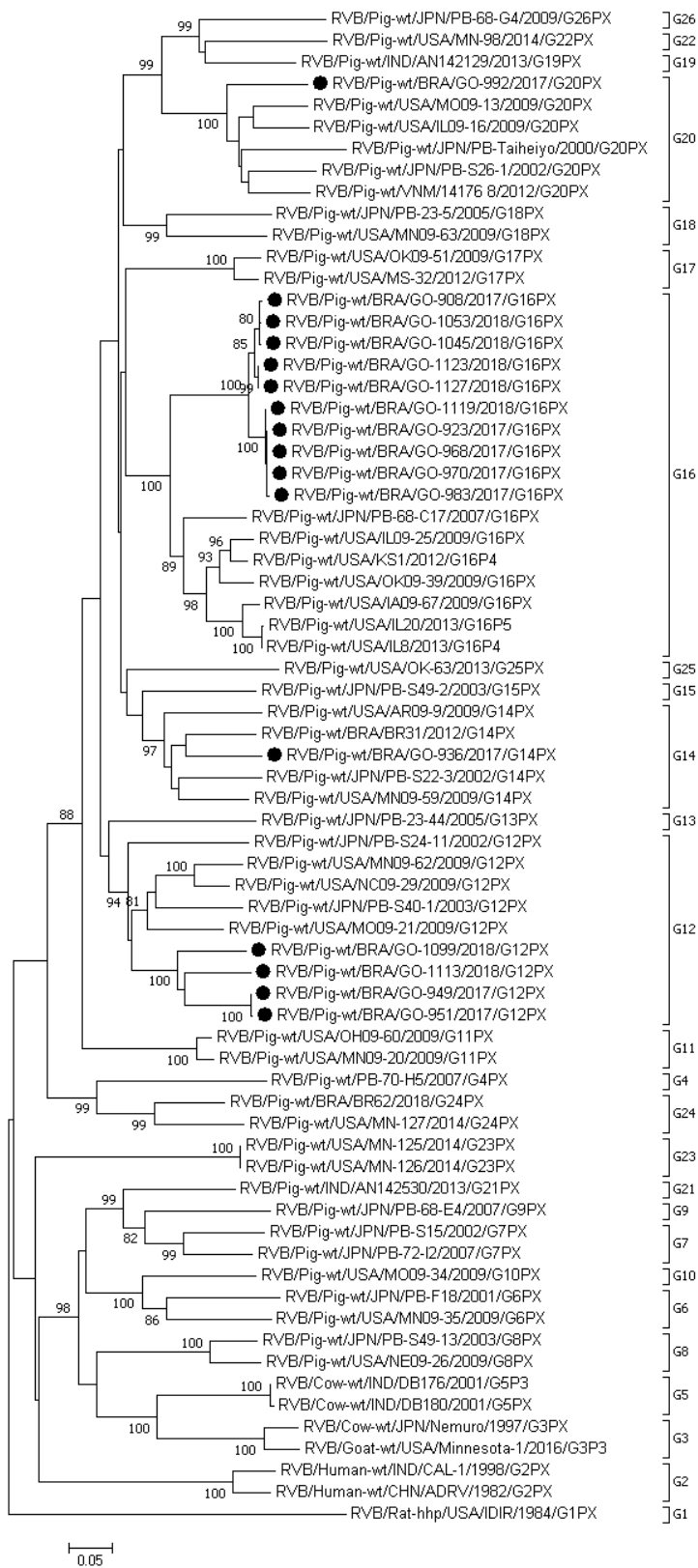
5  
6 **Conflict of interest**

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



11  
12 **Figure 1.** Histopathological findings in jejunum observed in newborn piglets naturally  
13 infected by Rotavirus B. A) Observed marked atrophic enteritis with villous atrophy and  
14 blunting. B) Severe atrophic enteritis with villous fusion (arrow) and hyperplasia of Peyer  
15 patches (asterisk). Hematoxylin & Eosin stain. Bar, A, B 100 µm. Magnification, ×40.

16  
17  
18



1

2 **Figure 2.** Phylogenetic tree based on nucleotide sequences (700 nt) of the VP7 gene of porcine  
 3 RVB strains described in this study and representative strains of the 26 previously identified  
 4 RVB G genotypes<sup>12</sup>. The tree was constructed using the neighbor-joining method based on the  
 5 Kimura 2-parameter model. The scale bar indicates nt substitutions per site. The bootstrap  
 6 values (1,000 replicates) are shown at the branch nodes (values <80% not shown). The  
 7 Brazilian porcine RVB strains are marked with filled circles.

Pig herd	Sampling	Month/Year of sampling	RVB positive/ total samples	Mean viral load (genomic copies/g of faeces)	G genotype
A	1	Aug/2017	3/4	1.7 x 10 <sup>8</sup>	G16
	2	Oct/2017	1/1	1.3 x 10 <sup>5</sup>	-
	3	Feb/2018	5/5	1.7 x 10 <sup>8</sup>	G16
	4	Aug/2018	0/5	not tested	-
B	1	Aug/2017	5/6	2.0 x 10 <sup>8</sup>	G16
	2	Oct/2017	1/1	2.5 x 10 <sup>5</sup>	-
	3	Feb/2018	8/9	1.9 x 10 <sup>7</sup>	G16
	4	Aug/2018	3/5	2.3 x 10 <sup>3</sup>	-
C	1	Aug/2017	5/5	8.9 x 10 <sup>7</sup>	G16
	2	Sep/2017	5/5	6.6 x 10 <sup>7</sup>	G16
	3	Oct/2017	1/1	2.2 x 10 <sup>7</sup>	G16
	4	Jun/2018	3/4	2.6 x 10 <sup>3</sup>	G12
	5	Aug/2018	0/2	not tested	-
D	1	Aug/2017	1/5	3.6 x 10 <sup>7</sup>	G14
	2	Sep/2017	2/2	7.6 x 10 <sup>6</sup>	-
	3	Oct/2017	1/3	4.3 x 10 <sup>5</sup>	-
	4	Jun/2018	3/3	5.0 x 10 <sup>7</sup>	G16
	5	Aug/2018	0/5	not tested	-
E	1	Sep/2017	10/12	1.1 x 10 <sup>7</sup>	G12
F	1	Oct/2017	1/1	3.5 x 10 <sup>7</sup>	G20
G	1	Jun/2018	1/1	9.1 x 10 <sup>7</sup>	G16
H	1	Jun/2018	5/5	2.1 x 10 <sup>3</sup>	G12
<b>Total</b>			<b>64/90</b>		

1  
2  
3  
4  
5

**Table 1.** Distribution of total biological samples positives for RVB and respective viral load and G genotypes identified by pig herds and sampling.

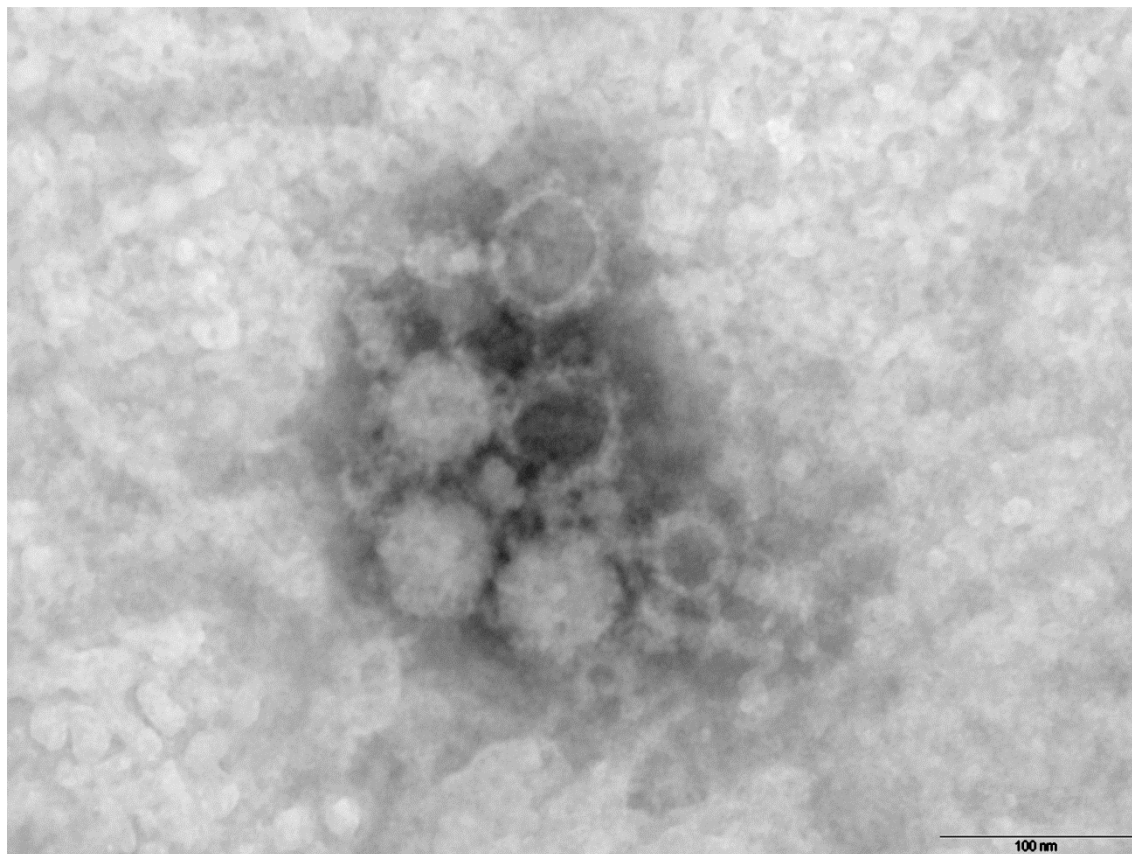
Virus	Viral Gene	Primer sequence (5' - 3')	Primer position	RT-PCR product (bp)	Reference
RVA	VP4	Fw-TGGCTTCGCCATTTLATAGACA Rv-ATTTTCGGACCATTTATAACC	12-33 868-887	876	39
	VP7	Fw-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG Rv-GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1-21 1038-1062	1062	40
RVB	NSP2	Fw-CTATTCAGTGTGTCG TGAGAGG Rv-CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC	1-18 434-451	434	41
RVB	VP7	Fw-GCGTTGCCACTGCTTCTC Rv-TTTTTATTGGCTTCGGCTACTC	18-35 796-817	800	15
RVC	VP6	Fw-GGCTTTAAAATCTCATTCA Rv-CCTCTAGTTGATTGAACATA	1-20 251-270	270	42
RVH	VP6	Fw-ACCAGGTGGAGCAACAAACA Rv-CAGTGCCTGACCAGATCTCA	529-549 1225-1244	716	43
SDCoV	M	Fw-ATCCTCCAAGGAGGCTATGC Rv-GCGAATTCTGGATCGTTGTT	67-87 540-560	493	44
TGEV	S	Fw-GTGGTTTTGGTYRTAAATGC Rv-CACTAACCAACGTGGARCTA	16-35 855-874	859	45
PEDV	S	Fw-TTCTGAGTCACGAACAGCCA Rv-CATATGCAGCCTGCTCTGAA	1466-1485 2097-2116	651	45

SVV	VP1	Fw-ACTGACACCGATTTCTCTG Rv-CTAAAGTAAGTGAAACAGGC	2730-2749 3026-3046	316	46
PEV	5' NTR	Fw-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG Rv-GTTAGGATTAGCCGCATTCAGGGG	197-271 486-509	313	47

1

2 **Table 2.** Gene targets and respective RT-PCR products used to identify enteric viruses in pig  
3 samples.

4



5

6 **Supplementary Figure S1.** Negative staining of Rotavirus-like particles in a faecal sample  
7 analysed by transmission electron microscopy. Bar, 100 nm. Magnification,  $\times 100,000$ .

8

1 **Supplementary Table S2.** Identity matrix of G genotypes of RVB strains described in this study and representative strains of the 26 previously  
 2 identified RVB G genotypes.

	GO-949	GO-951	GO-1099	GO-1113	GO-936	GO-908	GO-923	GO-968	GO-970	GO-983	GO-1045	GO-1053	GO-1119	GO-1123	GO-1127	GO-992
<b>G1</b>	58	58	57	58.3	55.7	58.8	59.2	59.2	59.2	59	58.8	58.8	59	58.6	58.6	54.7
<b>G2</b>	61.7-62.4	61.8-62.3	61.8-62.6	61.4-62.7	60.1-60.7	61-61.7	59.7-60.5	59.7-60.5	59.7-60.5	59.5-60.4	61-61.8	60.8-61.7	59.8-60.7	60.8-61.8	60.8-61.8	57.5-57.9
<b>G3</b>	60.2-61.8	60.2-61.8	59.2-60.4	59.7-60.7	57.9-58.9	57.1-58.4	57.2-57.9	57.2-57.9	57.2-57.9	57.3-58.1	56.9-58.5	57.1-58.4	57.3-58.1	57.5-58.5	57.5-58.7	56.5-57.3
<b>G4</b>	65.3	65.2	66	64	66.8	60.4	60.7	60.7	60.7	60.8	60.8	60.7	60.7	60.8	60.8	60.7
<b>G5</b>	61.8-62	61.7-61.8	60.5-61	60.5-61	59.8-60.1	59.5-60	59.5-59.7	59.5-59.7	59.5-59.7	59.7-59.8	59.7-60.1	59.8-60.2	59.7-59.8	59.7-60.1	59.7-60.1	56.9-57.2
<b>G6</b>	62-62.7	62-62.6	60.5-61.3	61.3-62.1	60.5-60.8	60.5-61.1	60.1-60.4	60.1-60.4	60.1-60.4	60.2-60.5	60.8-61	60.7-61.1	60.2-60.5	61-61.5	61-61.5	57.1-57.5
<b>G7</b>	62.7	62.7	62.7	62.1-62.3	62.4-63.4	60.8-61.4	61-62	61-62	61-62	61.1-61.2	61.3	61.1-61.4	61-62	60.8-61.1	60.8-61.1	57.5-58.9
<b>G8</b>	61.8-62.8	61.7-62.7	62.1-64.7	61.7-62.7	60.2-62.3	59.7-61.1	60.4-62.3	60.4-62.3	60.4-62.3	60.5-62.1	59.4-61.7	59.5-61.8	60.2-62.1	60.1-62.4	60.1-62.4	59.5-61
<b>G9</b>	62.1	62.1	62	60.8	62	59.7	60.1	60.1	60.1	60	59.4	59.5	60.1	59.8	59.8	58.1
<b>G10</b>	61	60.8	60.8	61.5	61.7	62	61.4	61.4	61.4	61.5	62.4	62.3	61.5	62.4	62.4	59.5
<b>G11</b>	68.2-71.1	68.1-71	69.5-71.1	69.4-71.6	72.4-73.2	70.5-72.7	70.8-72.9	70.8-72.9	70.8-72.9	70.7-72.7	70.5-72.7	70.7-72.9	70.8-72.9	71-73	71-73	66.9-71
<b>G12</b>	77.5-80.4	77.4-80.3	77.2-80.3	77.1-80.3	72.9-74	71.3-73.9	71-73.7	71-73.7	71-73.7	70.8-73.6	71.6-73.6	71.4-74	71.1-73.9	71.4-74.2	71.4-74.2	68.1-71.1
<b>G13</b>	73	72.9	72.7	74.3	74.6	72.3	72.7	72.7	72.7	72.6	72.3	72.4	72.9	72.3	72.3	71.7
<b>G14</b>	72.3-74.9	72.4-74.8	72.9-75.2	72.9-74.8	80-84.4	73.6-74.8	73.7-74.5	73.7-74.5	73.7-74.5	73.6-74.6	73.5-75.2	73.6-75.1	73.7-74.9	73.9-75.4	73.9-75.4	69.7-71.7
<b>G15</b>	71.9	71.7	72.6	73.9	77	74	74.2	74.2	74.2	74	73.9	74	74.3	74.3	74.3	70.1
<b>G16</b>	71.4-72.9	71.3-72.7	70.8-73.3	71.9-73.2	74.3-75.6	82-83.4	81.5-82.5	81.5-82.5	81.5-82.5	81.3-82.3	82.3-83.6	82.2-83.5	81.6-82.6	82.3-83.9	82.3-83.9	71.6-73.6
<b>G17</b>	70.4-71.3	70.3-71.1	72.4-72.9	71.1-72.3	74.5	75.4	75.4-75.6	75.4-75.6	75.4-75.6	75.2-75.5	75.4-75.6	75.5	75.5-75.8	75.6-76.1	75.6-76.1	70.8-71.4
<b>G18</b>	70.1-72.6	70-72.4	69.4-72.1	70.8-71.6	72.7-73.9	73-75.4	73-74.6	73-74.6	73-74.6	72.9-74.5	73.2-75.5	73.3-75.4	73.2-74.8	72.3-75.8	72.3-75.8	72.1-72.4
<b>G19</b>	59.3	59.3	58.8	60.2	59.5	60.4	60.4	60.4	60.4	60.5	60.6	60.5	60.5	60.8	60.8	62
<b>G20</b>	69.2-71	69.1-70.1	67.5-71.1	68.8	68.4-70.5	67.8-71.6	67.5-71.4	67.5-71.4	67.5-71.4	67.6-71.6	67.8-71.7	67.9-71.6	67.5-71.4	67.9-71.7	67.9-71.7	81.3-85.4
<b>G21</b>	63.9	63.9	64.4	62.7	64.2	63.3	62	62	62	61.8	63.4	63.3	62.1	63.3	63.3	60.5
<b>G22</b>	69.2	69.2	68.8	67.6	68.9	69.8	70.3	70.3	70.3	70.1	70	69.8	70.4	69.8	69.8	72.9
<b>G23</b>	62.4	62.3	62.7	62.3	61.8	63	61.8	61.8	61.8	62	63	63	62	62.8	62.8	59.7
<b>G24</b>	67.2	67.1	67.2	67.2	66.6	63.7	63.7	63.7	63.7	63.6	64.2	64	63.7	63.9	63.9	63.3
<b>G25</b>	73.2	73	73.7	72.1	72.6	73.5	72.7	72.7	72.7	72.6	73.3	73.5	72.9	73.7	73.7	69.1
<b>G26</b>	66.6	66.6	68.1	66.6	66.8	68.2	68.6	68.6	68.6	68.8	68.2	68.3	68.8	68.8	68.8	70.1

- 1 **Supplementary Table S3.** Accession number of the G genotypes of RVB strains used to  
 2 construct the phylogenetic tree and the identity matrix. The Brazilian porcine RVB strains  
 3 described in the present study are marked with filled circles.

<b>RVB G genotype</b>	<b>Accession number</b>	<b>Strain</b>
G1	D00911	RVB/Rat-hhp/USA/IDIR/1984/G1P[X]
G2	AY539856	RVB/Human-wt/CHN/WH-1/2002/G2P[X]
	AF184083	RVB/Human-wt/IND/CAL-1/1998/G2P[X]
G3	AB016818	RVB/Cow-wt/JPN/Nemuro/1997/G3P[X]
	KY689695	RVB/Goat-wt/USA/Minnesota-1/2016/G3P[3]
G4	AB490451	RVB/Pig-wt/PB-70-H5/2007/G4P[X]
G5	AF531910	RVB/Cow-wt/IND/DB176/2001/G5P[3]
	AF529214	RVB/Cow-wt/IND/DB180/2001/G5P[X]
G6	AB490417	RVB/Pig-wt/JPN/PB-F18/2001/G6P[X]
	JQ043782	RVB/Pig-wt/USA/MN09-35/2009/G6P[X]
G7	AB490423	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S15/2002/G7P[X]
	AB490454	RVB/Pig-wt/JPN/PB-72-I2/2007/G7P[X]
G8	AB490436	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S49-13/2003/G8P[X]
	JQ043773	RVB/Pig-wt/USA/NE09-26/2009/G8P[X]
G9	AB490448	RVB/Pig-wt/JPN/PB-68-E4/2007/G9P[X]
G10	JQ043781	RVB/Pig-wt/USA/MO09-34/2009/G10P[X]
G11	JQ043807	RVB/Pig-wt/USA/OH09-60/2009/G11P[X]
	JQ043767	RVB/Pig-wt/USA/MN09-20/2009/G11P[X]
G12	AB490426	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S24-11/2002/G12P[X]
	AB490429	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S40-1/2003/G12P[X]
	JQ043809	RVB/Pig-wt/USA/MN09-62/2009/G12P[X]
	JQ043768	RVB/Pig-wt/USA/MO09-21/2009/G12P[X]
	JQ043776	RVB/Pig-wt/USA/NC09-29/2009/G12P[X]
	MN540129	RVB/Pig-wt/BRA/GO-949/2017/G12P[X]●
	MN540130	RVB/Pig-wt/BRA/GO-951/2017/G12P[X]●
MN540137	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1099/2018/G12P[X]●	
MN540138	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1113/2018/G12P[X]●	
G13	AB490445	RVB/Pig-wt/JPN/PB-23-44/2005/G13P[X]
G14	KX376976	RVB/Pig-wt/BRA/BR31/2012/G14P[X]
	AB490425	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S22-3/2002/G14P[X]
	JQ043806	RVB/Pig-wt/USA/MN09-59/2009/G14P[X]
	JQ043756	RVB/Pig-wt/USA/AR09-9/2009/G14P[X]
	MN540128	RVB/Pig-wt/BRA/GO-936/2017/G14P[X]●
G15	AB490435	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S49-2/2003/G15P[X]
G16	AB490446	RVB/Pig-wt/JPN/PB-68-C17/2007/G16P[X]
	JQ043772	RVB/Pig-wt/USA/IL09-25/2009/G16P[X]
	JQ043786	RVB/Pig-wt/USA/OK09-39/2009/G16P[X]
	JQ043814	RVB/Pig-wt/USA/IA09-67/2009/G16P[X]
	MG272202	RVB/Pig-wt/USA/IL20/2013/G16P[5]
	MG272190	RVB/Pig-wt/USA/IL8/2013/G16P[4]

	MG272204	RVB/Pig-wt/USA/KS1/2012/G16P[4]
	MN540126	RVB/Pig-wt/BRA/GO-908/2017/G16P[X]●
	MN540127	RVB/Pig-wt/BRA/GO-923/2017/G16P[X]●
	MN540131	RVB/Pig-wt/BRA/GO-968/2017/G16P[X]●
	MN540132	RVB/Pig-wt/BRA/GO-970/2017/G16P[X]●
G16	MN540133	RVB/Pig-wt/BRA/GO-983/2017/G16P[X]●
	MN540135	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1045/2018/G16P[X]●
	MN540136	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1053/2018/G16P[X]●
	MN540139	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1119/2018/G16P[X]●
	MN540140	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1123/2018/G16P[X]●
	MN540141	RVB/Pig-wt/BRA/GO-1127/2018/G16P[X]●
G17	JQ043799	RVB/Pig-wt/USA/OK09-51/2009/G17P[X]
	MF522294	RVB/Pig-wt/USA/MS-32/2012/G17P[X]
G18	AB490443	RVB/Pig-wt/JPN/PB-23-5/2005/G18P[X]
	JQ043810	RVB/Pig-wt/USA/MN09-63/2009/G18P[X]
G19	KJ613649	RVB/Pig-wt/IND/AN142129/2013/G19P[X]
G20	AB490418	RVB/Pig-wt/JPN/PB-Taiheiyo/2000/G20P[X]
	AB490427	RVB/Pig-wt/JPN/PB-S26-1/2002/G20P[X]
	KX362394	RVB/Pig-wt/VNM/14176_8/2012/G20P[X]
	JQ043760	RVB/Pig-wt/USA/MO09-13/2009/G20P[X]
	JQ043763	RVB/Pig-wt/USA/IL09-16/2009/G20P[X]
	MN540134	RVB/Pig-wt/BRA/GO-992/2017/G20P[X]●
G21	KJ613650	RVB/Pig-wt/IND/AN142530/2013/G21P[X]
G22	MF072691	RVB/Pig-wt/BRA/BR62/2018/G22P[X]
	MF522360	RVB/Pig-wt/USA/MN-98/2014/G22P[X]
G23	MF522387	RVB/Pig-wt/USA/MN-125/2014/G23P[X]
	MF522388	RVB/Pig-wt/USA/MN-126/2014/G23P[X]
G24	MF522389	RVB/Pig-wt/USA/MN-127/2014/G24P[X]
	KX362405	RVB/Pig-wt/VNM/14177_18/2012/G24P[X]
G25	MF522325	RVB/Pig-wt/USA/OK-63/2013/G25P[X]
G26	AB490449	RVB/Pig-wt/JPN/PB-68-G4/2009/G26P[X]

## 4 CONCLUSÕES

---

- RVB foi detectado como agente primário de surtos de diarreia em leitões neonatos em rebanhos suínolas da região centro-oeste do Brasil, com a maior frequência de RVB já descrita em leitões com diarreia, principalmente em infecção singular.
- Foram observadas lesões histopatológicas acentuadas, como atrofia de vilosidades e hiperplasia de placas de Peyer, em fragmentos de intestino delgado de leitões com diarreia positivos para RVB.
- Partículas com morfologia semelhantes à RV foram observadas por ME em uma amostra fecal positiva para RVB na RT-PCR convencional.
- RVB não foi isolado a partir de amostras fecais em células MA-104.
- Cargas virais moderadas a altas foram detectadas em amostras positivas para RVB pela técnica de qRT-PCR com *TaqMan*.
- Análises filogenéticas do gene que codifica a proteína VP7 de cepas de RVB selecionadas nesse estudo revelaram a circulação de quatro genótipos G diferentes (G12, G14, G16 e G20) em uma única região geográfica do Brasil.
- Este estudo destaca a necessidade de incluir RVB, junto com as espécies RVA e RVC, na rotina de diagnóstico de doenças entéricas de suínos.

## 5 PERSPECTIVAS

---

1  
2  
3           Devido às perdas econômicas consideráveis que as doenças entéricas ocasionam na  
4 cadeia produtiva de suínos, principalmente no período neonatal, o monitoramento de  
5 microrganismos entéricos patogênicos é de grande importância para a manutenção das taxas de  
6 produção e produtividade na suinocultura. Surtos de diarreia em leitões ocasionados por RVA  
7 são comumente descritos no mundo todo desde a década de 70, no entanto, os programas de  
8 vacinação para controle e profilaxia de diarreia neonatal tem-se mostrado eficientes na redução  
9 das taxas de morbidade e mortalidade de leitões de maternidade. Porém, as vacinas comerciais  
10 para RV contemplam apenas cepas de RVA, o que, no campo, devido à pressão imunológica  
11 exercida pelos programas de vacinação, vem favorecendo a emergência de outras espécies de  
12 RV, como por exemplo RVB, RVC e RVH.

13           O presente estudo destaca a importância de incluir essas espécies de RV na rotina de  
14 diagnóstico de doenças entéricas em suínos, e além do diagnóstico etiológico, reforça a  
15 importância de definir os genótipos dos RV encontrados, para uma melhor compreensão da  
16 epidemiologia dessa virose entérica.

17           Devido às dificuldades para isolamento de RVB em cultivo celular, este estudo  
18 também abre perspectivas para o desenvolvimento e pesquisa de possíveis vacinas de  
19 subunidade, contemplando os principais genótipos circulantes nos rebanhos suínos  
20 brasileiros.

## ANEXO A - Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) P.M. 58,08 (Dinâmica<sup>®</sup>)
2. Ácido acético glacial, P.A. ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) P.M. 60,05 (Nuclear<sup>®</sup>)
3. Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) P.M. 61,83 (Sicalab<sup>®</sup>)
4. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen<sup>®</sup>)
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen<sup>®</sup>)
6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{2H}_2\text{O}$ ) P.M. 372,24 (Reagen<sup>®</sup>)
7. Ácido fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) P.M. 2,88 (Dinâmica<sup>®</sup>)
8. Agarose (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
9. Água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
10. Álcool etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) P.M. 46,07 (Nuclear<sup>®</sup>)
11. Álcool isoamílico ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) P.M. 88,15 (Synth<sup>®</sup>)
12. Bicarbonato de sódio, P.A. ( $\text{NaHCO}_3$ ) P.M. 84,01 (Biotec<sup>®</sup>)
13. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
14. Brometo de etídeo ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ ) P.M. 394,3 (Sigma<sup>®</sup>)
15. Cloreto de cálcio puro ( $\text{CaCl}_2$ ) P.M. 110,94 (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
16. Cloreto de magnésio 50 mM ( $\text{MgCl}_2$ ) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
17. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen<sup>®</sup>)
18. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen<sup>®</sup>)
19. Clorofórmio, P.A. ( $\text{CHCl}_3$ ) P.M. 119,38 (Dinâmica<sup>®</sup>)
20. Dimetil sulfóxido (DMSO)  $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$  (Sigma<sup>®</sup>)
21. Dióxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) P.M. 60,08 (Sigma<sup>®</sup>)
22. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
23. DNA Ladder (100 pb) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
24. dNTP Set (100 mM), 4 x 250  $\mu\text{L}$ ; 25  $\mu\text{mol}$  cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
25. Dodecil 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<sup>®</sup>)

26. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco BRL<sup>®</sup>)
27. Eosina (Nuclear<sup>®</sup>)
28. Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
29. Formaldeído P.A. (Vetec<sup>®</sup>)
30. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) P.M. 141,96 (Synth<sup>®</sup>)
31. Fosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O) P.M 177,99 (Merck<sup>®</sup>)
32. Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O) P.M. 155,99 (Reagen<sup>®</sup>)
33. Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) P.M. 180,16 (Reagen<sup>®</sup>)
34. Hematoxilina (Nuclear<sup>®</sup>)
35. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica<sup>®</sup>)
36. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab<sup>®</sup>)
37. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL<sup>®</sup>)
38. Metanol P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Allkimia<sup>®</sup>)
39. *M-MLV<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase 200 units* (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primers e probe*)
  - Con3 (VP4/RVA) (forward; 5'-TGGCTTCGCCATTTLATAGACA-3') – GENTSCH *et al.* (1992) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - Con2 (VP4/RVA) (reverse; 5'-ATTTTCGGACCATTATAACC-3') – GENTSCH *et al.* (1992) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - Beg9 (VP7/RVA) (forward; 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3') – GOUVEA *et al.* (1990) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - End9 (VP7/RVA) (reverse; 5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3') – GOUVEA *et al.* (1990) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - B1 (NSP2/RVB) (forward; 5'-CTATTCAGTGTGTCG TGAGAGG-3') – GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - B4 (NSP2/RVB) (reverse 1; 5'-CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG-3') – GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - B3 (NSP2/RVB) (reverse 2; 5'-CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC-3') – GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - BMJ41 (VP6/RVC) (forward; 5'-GGCTTTAAAAATCTCATTCA-3') – ALFIERI *et al.* (1999) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - BMJ42 (VP6/RVC) (reverse; 5'-CCTCTAGTTGATTGAACATA-3') – ALFIERI *et al.* (1999) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)

- RVN-1F (VP6/RVH) (forward; 5'-ACCAGGTGGAGCAACAAACA-3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- RVN-1R (VP6/RVH) (reverse; 5'-CAGTGCGTGACCAGATCTCA-3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- 67F (M/SDCoV) (forward; 5'-ATCCTCCAAGGAGGCTATGC-3') – WANG *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- 560R (M/SDCoV) (reverse; 5'-GCGAATTCTGGATCGTTGTT-3') – WANG *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- T1 (S/TGEV) (forward; 5'-GTGGTTTTGGTYRTAAATGC-3') – KIM *et al.* (2001) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- T2 (S/TGEV) (reverse; 5'-CACTAACCAACGTGGARCTA-3') – KIM *et al.* (2001) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- P1 (S/PEDV) (forward; 5'-TTCTGAGTCACGAACAGCCA-3') – KIM *et al.* (2001) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- P2 (S/PEDV) (reverse; 5'-CATATGCAGCCTGCTCTGAA-3') – KIM *et al.* (2001) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- SVV2682FW (VP1/SVV) (forward; 5'-TTCCACTCCACCGACAACG-3') – FERRONATO *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- SVV3224RV (VP1/SVV) (reverse; 5'-GATACCTTCCCACCCTTGC-3') – FERRONATO *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- SVV-2730FW (VP1/SVV) (forward; 5'-ACTGACACCGATTTCTCTG-3') – FERRONATO *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- SVV3046RV (VP1/SVV) (reverse; 5'-CTAAAGTAAGTGAAACAGGC-3') – FERRONATO *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- Pev-9a (5' NTR/PEV) (forward; 5'-GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA-3') – KRUMBHOLZ *et al.* (2003) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- Pev-9b (5' NTR/PEV) (reverse; 5'-ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC-3') – KRUMBHOLZ *et al.* (2003) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- Pev-9c (5' NTR/PEV) (forward; 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3') – KRUMBHOLZ *et al.* (2003) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
- Pev-9e (5' NTR/PEV) (reverse; 5'-GTTAGGATTAGCCGCATTCAGGGG-3') – KRUMBHOLZ *et al.* (2003) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)

- PB-F18-Fw (VP7/RVB) (forward; 5'-GCGTTGCCACTGCTTCTC-3') – KUGA *et al.* (2009) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - PB-F18-Rv (VP7/RVB) (reverse; 5'-TTTTTATTGGCTTCGGCTACTC-3') – KUGA *et al.* (2009) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - qRVB1174-Fw (VP6/RVB) (forward; 5'-TGTTAGTATCCGCATTTGCTG-3') – *this study* - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - qRVB1269-Rv (VP6/RVB) (reverse; 5'-GGGTTTTATTGCTTATTTTTTCG-3') – *this study* - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
  - qRVB1206-pb (VP6/RVB) (5'-FAM-TCCGGCGTCAGCTCCCAAAGG-MGB-3') – *this study* - 63 pmol (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>)
41. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  42. Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  43. 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<sup>®</sup>)
  44. PureLink<sup>™</sup> Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  45. RT-buffer (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  46. Soro fetal bovino (Gibco BRL<sup>®</sup>)
  47. SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase 200 units (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  48. SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase 200 units (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  49. SuperScript<sup>™</sup> III Platinum<sup>™</sup> One-Step Quantitative RT-PCR System 100 reactions (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  50. QuantIT<sup>™</sup> dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  51. Sacarose, P.A. – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) P.M. 342,31 (Reagen<sup>®</sup>)
  52. TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kits for Sequencing (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
  53. TripLE<sup>™</sup> Express Stable Trypsin-like Enzyme (Gibco<sup>®</sup>)
  54. Tris (Nuclear<sup>®</sup>)
  55. Triton x-100 (Synth<sup>®</sup>)
  56. Xileno P.A. (Nuclear<sup>®</sup>)
  57. Vermelho de fenol (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>S) P.M. 354,38 (Reagen<sup>®</sup>)

## ANEXO B - Soluções e Tampões

- **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

- **Diluição de *primers e probe***

Vírus/gene	Primer Forward	Primer Reverse
RT-PCR RVA/VP4	- Primer Con3 Concentração: 20,46 nmol Data de fabricação: Jul/2009 $20,46 \times 1000 = 20460$ pmol $20460 / 200 = 102,3$ µL de água ultrapura	- Primer Con2 Concentração: 27,42 nmol Data de fabricação: Dez/2008 $27,42 \times 1000 = 27420$ pmol $27420 / 200 = 137,1$ µL de água ultrapura
RT-PCR RVA/VP7	- Primer Beg9 Concentração: 19,28 nmol Data de fabricação: Set/2008 $19,28 \times 1000 = 19280$ pmol $19280 / 200 = 96,4$ µL de água ultrapura	- Primer End9 Concentração: 22,52 nmol Data de fabricação: Set/2009 $22,52 \times 1000 = 22520$ pmol $22520 / 200 = 112,6$ µL de água ultrapura
SN-PCR RVB/NSP2	- Primer B1 Concentração: 68,6 nmol Data de fabricação: Mar/2012 $68,6 \times 1000 = 68600$ pmol $68600 / 200 = 343$ µL de água ultrapura	- Primer B4 Concentração: 35,8 nmol Data de fabricação: Mar/2012 $35,8 \times 1000 = 35800$ pmol $35800 / 200 = 179$ µL de água ultrapura
		- Primer B3 Concentração: 30,3 nmol Data de fabricação: Mar/2012 $30,3 \times 1000 = 30300$ pmol $30300 / 200 = 151,5$ µL de água ultrapura
RT-PCR RVC/VP6	- Primer BMJ41 Concentração: 26,17 nmol Data de fabricação: Out/2009 $26,17 \times 1000 = 26170$ pmol $26170 / 200 = 130,85$ µL de água ultrapura	- Primer BMJ42 Concentração: 24,85 nmol Data de fabricação: Out/2009 $24,85 \times 1000 = 24850$ pmol $24850 / 200 = 124,25$ µL de água ultrapura
RT-PCR RVH/VP6	- Primer RVN-1F Concentração: 15,88 nmol	- Primer RVN-1R Concentração: 18,94 nmol

	Data de fabricação: Dez/2012 15,88 x 1000 = 15880 pmol 15880 / 200 = 79,4 µL de água ultrapura	Data de fabricação: Dez/2012 18,94 x 1000 = 18940 pmol 18940 / 200 = 97,7 µL de água ultrapura
RT-PCR SDCoV/M	- Primer 67F Concentração: 58,6 nmol Data de fabricação: Dez/2012 58,6 x 1000 = 58600 pmol 58600 / 200 = 293 µL de água ultrapura	- Primer 560R Concentração: 61,4 nmol Data de fabricação: Dez/2012 61,4 x 1000 = 61400 pmol 61400 / 200 = 307 µL de água ultrapura
RT-PCR TGEV/S	- Primer T1 Concentração: 24,2 nmol Data de fabricação: Nov/2013 24,2 x 1000 = 24200 pmol 24200 / 200 = 121 µL de água ultrapura	- Primer T2 Concentração: 22,67 nmol Data de fabricação: Nov/2013 22,67 x 1000 = 22670 pmol 22670 / 200 = 113,4 µL de água ultrapura
RT-PCR PEDV/S	- Primer P1 Concentração: 83,4 nmol Data de fabricação: Abr/2014 83,4 x 1000 = 83400 pmol 83400 / 200 = 417 µL de água ultrapura	- Primer P2 Concentração: 78,8 nmol Data de fabricação: Abr/2014 78,8 x 1000 = 78800 pmol 78800 / 200 = 394 µL de água ultrapura
Nested-PCR SVV/VP1	- Primer SVV-2682FW (RT-PCR) Concentração: 41,1 nmol Data de fabricação: Fev/2015 41,1 x 1000 = 41100 pmol 41100 / 200 = 205,5 µL de água ultrapura	- Primer SVV-3224RV (RT-PCR) Concentração: 30,7 nmol Data de fabricação: Fev/2015 30,7 x 1000 = 30700 pmol 30700 / 200 = 153,5 µL de água ultrapura
	- Primer SVV-2730FW (Nested) Concentração: 46,7 nmol Data de fabricação: Fev/2015 46,7 x 1000 = 46700 pmol 46700 / 200 = 233,5 µL de água ultrapura	- Primer SVV3046RV (Nested) Concentração: 42,5 nmol Data de fabricação: Fev/2015 42,5 x 1000 = 42500 pmol 42500 / 200 = 212,5 µL de água ultrapura
Nested-PCR PEV/5' NTR	- Primer 9a (RT-PCR) Concentração: 37,1 nmol Data de fabricação: Mar/2013 37,1 x 1000 = 37100 pmol 37100 / 200 = 185,5 µL de água ultrapura	- Primer 9b (RT-PCR) Concentração: 40,5 nmol Data de fabricação: Mar/2013 40,5 x 1000 = 40500 pmol 40500 / 200 = 202,5 µL de água ultrapura
	- Primer 9c (Nested)	- Primer 9e (Nested)

	Concentração: 28,6 nmol Data de fabricação: Mar/2013 $28,6 \times 1000 = 28600 \text{ pmol}$ $28600 / 200 = 143 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	Concentração: 32,1 nmol Data de fabricação: Mar/2013 $32,1 \times 1000 = 32100 \text{ pmol}$ $32100 / 200 = 160,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
RT-PCR RVB/VP7	- Primer PB-F18-Fw Concentração: 41 nmol Data de fabricação: Dez/2012 $41 \times 1000 = 41000 \text{ pmol}$ $41000 / 200 = 205 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	- Primer PB-F18-Rv Concentração: 38,3 nmol Data de fabricação: Dez/2012 $38,3 \times 1000 = 38300 \text{ pmol}$ $38300 / 200 = 191,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
qRT-PCR RVB/VP6	- Primer qRVB1174-Fw Concentração: 50,6 nmol Data de fabricação: Dez/2018 $50,6 \times 1000 = 50600 \text{ pmol}$ $50600 / 200 = 253 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura	- Primer qRVB1269-Rv Concentração: 47,1 nmol Data de fabricação: Dez/2018 $47,1 \times 1000 = 47100 \text{ pmol}$ $47100 / 200 = 235,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura
Probe	- Probe qRVB1206-pb Concentração: 6000 pmol em 60 $\mu\text{L}$ Data de fabricação: Dez/2018	

Solução estoque: ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10x [ ]. Primer mãe (200 pmol/ $\mu\text{L}$ )

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura. Primer uso 1x (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ).

- **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 1%**

- 0,5 g de agarose
- 50 mL de tampão TBE 1x
- 20  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio

- **Meio Luria Bertani (LB) sólido**

- 5 g de triptona
- 2,5 g de extrato de levedura
- 2,5 g de NaCl
- Dissolver em 400 mL de água destilada
- Completar para 500 mL (becker)
- 3,25 g de ágar em cada Erlenmeyer
- Adicionar 250 mL da solução a 3,25 g de ágar em cada Erlenmeyer que será autoclavado

- **Meio LB líquido**

- 5 g de triptona
- 2,5 g de extrato de levedura
- 2,5 g de NaCl
- Dissolver em 400 mL de água bidestilada e completar para 500 mL
- Aliquotar a solução em tubos de 3 mL e 5 mL e autoclavar

- **Hidratação da sílica**

- 6 g de sílica (SIGMA®)
- Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar

- **SDS 10%**

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

- **Solução L6**
  - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
  - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
  - 2,6 g de Triton 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**
  - Azul de bromofenol 0,25%
  - Sacarose – sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) 45%
  - Água bidestilada q.s.p. 100 mL
  
- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
  - Tris 0,89 M
  - Ácido bórico 0,89 M
  - EDTA 0,02 M
  - Água bidestilada q.s.p. 1 litro
  - Ajustar o pH (pH 8,4)
  
- **Tampão Fosfato Salina – PBS**
  - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
  - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)
  - 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro ( $Na_2HPO_4$ )
  - 15 mM Potássio fosfato monobásico ( $KH_2PO_4$ )
  - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL

## ANEXO C - Protocolos de Técnicas

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

1. Suspensão fecal – extração bruta

- 100 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 µg 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 isoamílico

- 500 µL da suspensão fecal ou 500 µL da suspensão de tecido
- Adicionar 50 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar a 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
- Incubar a 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 P.A. gelada
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar 10.000 x g/30 s
  - Desprezar sobrenadante

- Secar o pellet em termo bloco a 56°C (aproximadamente 2 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar a 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

- **RT-PCR para RVA (VP4/VP7) - primers Gentsch et al. 1992 e Gouvea et al. 1990 e RVC (VP6) – primers Alfieri et al. 1999**

<b>Mix Desnaturação (97°C/7min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Primer Fw</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Rv</i> (20 pmol)	1
Água ultrapura	3
RNA	5
Volume final	10

<b>Mix Transcrição reversa (RT) (42°C/30min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer 10X</i>	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
<i>SuperScript™ II</i> (200 U/µL)	0,15
Água ultrapura	5,85
Produto da desnaturação	10
Volume final	20

<b>Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer 10 x</i> (pH 8,4)	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> (5U/µL)	0,25
Água ultrapura	18,25
cDNA	25
Volume final	50

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR RVA (VP4/VP7)

Reação	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	3 min	1
Desnaturação	94°C	15 seg	40
Anelamento	42°C	15 seg	40
Extensão	72°C	45 seg	40
Extensão final	72°C	7 min	1

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR RVC (VP6)

Reação	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
	94°C	1 min	3
	40°C	2 min	3
	68°C	8 min	3
Desnaturação	94°C	1 min	30
Anelamento	52°C	2 min	30
Extensão	72°C	3 min	30
Extensão final	72°C	7 min	1

• Semi-Nested- RT-PCR para RVB (NSP2) – *primers* Gouvea et al. 1991

Mix Desnaturação (97°C/5min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Primer</i> B1 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> B4 (20 pmol)	1
Água ultrapura	3
RNA	5
Volume final	10

Mix Transcrição reversa (RT) (42°C/30min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
<i>SuperScript</i> <sup>TM</sup> II (200 U/µL)	0,15
Água ultrapura	5,85
Produto da desnaturação	10
Volume final	20

<b>Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Platinum</i> <sup>®</sup> Taq DNA <i>Polymerase</i> (5U/µL)	0,25
Água ultrapura	18,25
cDNA	25
Volume final	50

<b>Mix Desnaturação da Semi-Nested (97°C/5min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Primer</i> B1 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> B3 (20 pmol)	1
Água ultrapura	3
Produto da PCR	5
Volume final	10

<b>Mix da reação de Semi-Nested-PCR (SN-PCR)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Platinum</i> <sup>®</sup> Taq DNA <i>Polymerase</i> (5U/µL)	0,25
Água ultrapura	11,25
Produto da desnaturação SN-PCR	10
Volume final	30

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

<b>Reação</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos (PCR)</b>
Desnaturação	94°C	3 min	1
Desnaturação	94°C	45 seg	40
Anelamento	42°C	45 seg	40
Extensão	72°C	1 min	40
Extensão final	72°C	10 min	1

- Ciclos de tempo e temperatura da SN-PCR

Reação	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos (PCR)
Desnaturação	94°C	3 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	30
Anelamento	42°C	30 seg	30
Extensão	72°C	45 seg	30
Extensão final	72°C	7 min	1

- RT-PCR para RVH (VP6) – *primers* Molinari et al. 2015 e RVB (VP7) – *primers* Kuga et al. 2009

Mix Desnaturação (97°C/5min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Primer Fw</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Rv</i> (20 pmol)	1
Água ultrapura	5
RNA	5
Volume final	12

Mix Transcrição reversa (RT) (42°C/30min; 95°C/5min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer 5X</i>	4
DTT	2
dNTP (2,5 mM)	1
<i>SuperScript™ II</i> (200 U/µL)	0,5
Água ultrapura	0,5
Produto da desnaturação	12
Volume final	20

Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer 10 x</i> (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	2
<i>Primer Fw</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Rv</i> (20 pmol)	1
<i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i> (5U/µL)	0,5
Água ultrapura	34
cDNA	5
Volume final	50

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

<b>Reação</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos (PCR)</b>
Desnaturação	94°C	3 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	35
Anelamento	48°C	1 min	35
Extensão	72°C	1 min	35
Extensão final	72°C	10 min	1

- **RT-PCR para SDCoV (M), TGEV (S) e PEDV (S) – primers Wang et al. 2014 e Kim et al. 2001**

<b>Mix Desnaturação (65°C/5min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Primer Rv</i> (20 pmol)	2
dNTP	1
Água ultrapura	6
RNA	5
Volume final	14

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

<b>Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer 10 x</i> (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
Primer Fw (20 pmol)	1
Primer Rv (20 pmol)	1
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> (5U/µL)	0,5
Água ultrapura	35
cDNA	5
Volume final	50

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

<b>Reação</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos (PCR)</b>
Desnaturação	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	35
Anelamento	55°C	1 min	35
Extensão	72°C	1 min	35
Extensão final	72°C	7 min	1

• **Nested-RT-PCR para PEV (5' NTR) - primers Krumbholz et al. 2003**

<b>Mix Desnaturação (65°C/5min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Primer 9b</i> (20 pmol)	2
dNTP	1
Água ultrapura	6
RNA	5
Volume final	14

<b>Transcrição reversa (37°C/50 min; 70°C/15 min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer 5X</i>	4
DTT (100 mM)	1
<i>M-MLV<sup>TM</sup></i> (200 U/µL)	1
Produto da desnaturação	14
Volume final	20

<b>Mix Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer 10 x</i> (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Primer 9a</i> (20 pmol)	0,5
<i>Primer 9b</i> (20 pmol)	0,5
<i>Platinum<sup>®</sup>Taq DNA Polymerase</i> (5U/µL)	0,4
Água ultrapura	37,1
cDNA	5
Volume final	50

<b>Mix Reação Nested-PCR</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
Buffer 10 x (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
Primer 9c (20 pmol)	0,5
Primer 9e (20 pmol)	0,5
<i>Platinum</i> <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (5U/µL)	0,4
Água ultrapura	39,1
Produto da PCR	2
Volume final	50

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

<b>Reação</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos (PCR)</b>	<b>Nº de Ciclos (Nested)</b>
Desnaturação	94°C	5 min	1	1
Desnaturação	94°C	1 min	35	30
Anelamento	55°C	1 min	35	30
Extensão	72°C	1 min	35	30
Extensão final	72°C	7 min	1	1

**• Tamanho esperado dos produtos amplificados**

<b>Vírus</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto da PCR/Nested-PCR (pb)</b>
RVA	VP4	876
RVA	VP7	1062
RVB	NSP2	489 / 434
RVB	VP7	800
RVC	VP6	270
RVH	VP6	716
SDCoV	M	493
TGEV	S	859
PEDV	S	651
SVV	VP1	316
PEV	5' NTR	491 / 313

- **Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (qRT-PCR) – RVB (VP6) – fragmento de 95 pb**

<b>Mix Reação qRT-PCR</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>2X Reaction Mix</i>	12,5
<i>Rox™ Reference Dye (25 µM)</i>	0,1
<i>SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix</i>	0,5
<i>Primer qRVB-Fw (5 pmol)</i>	2
<i>Primer qRVB-Rw (5 pmol)</i>	2
<i>Probe qRVB-Pb (200 nM)</i>	2
Água ultrapura	0,9
RNA	5
Volume final	25

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

<b>Reação</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos</b>
RT	50	15 min	1
Desnaturação	95	2 min	1
Desnaturação	95	15 seg	40
Anelamento/Extensão	60	30 seg	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
- 25 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.

• **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 a seguir:

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

<b>Reagente*</b>	<b>Volume</b>
<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\*

<b>Reação</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	15 seg	35
Anelamento	50	15 seg	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 2720 x g durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.

- Centrifugar a 2720 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.

#### • Clonagem do produto da qRT-PCR

##### Pré-inoculação de *E.coli One Shot*<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)

1. Em um tubo de 3 mL de meio LB líquido autoclavado acrescentar 15 µL de células de *E. coli*.
2. Homogeneizar lentamente o tubo com LB.
3. Incubar em *Shaker* à 37°C e 180 rpm, *overnight*.

##### Ligação do produto da PCR ao vetor

1. Em um microtubo (0,5 mL) adicionar o DNA purificado a ser clonado: 0,5 a 4 µL.
2. Adicionar 1 µL da solução de 1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl<sub>2</sub>.
3. Adicionar 1 µL *pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> TA vector*.
4. Adicionar H<sub>2</sub>O autoclavada q.s.p 6 µL.
5. Homogeneizar a reação delicadamente e incubar por 1 h, em temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, manter a reação em gelo até proceder à transformação.

##### Preparação de células competentes

1. Diluir 150 µL da pré-cultura em 5 mL de meio LB líquido e incubar à 37°C, 180 rpm, até DO 600 nm = 0,4 - 0,6 (aproximadamente 1 h).
  2. Logo após, deixar o tubo em banho de gelo por 5 min.
  3. Centrifugar 3 mL da cultura em dois microtubos (1,5 mL em cada tubo), a 5000 rpm/5 min.
- Obs: Manter as células e soluções em banho de gelo.

4. Descartar o sobrenadante por inversão do tubo e adicionar ao precipitado 500  $\mu$ L de 50 mM  $\text{CaCl}_2$ .
5. Homogeneizar.
6. Transferir o conteúdo dos dois tubos para outro tubo.
7. Manter em banho de gelo por 10 min.
8. Centrifugar a 5000 rpm/5 min e eliminar o sobrenadante posteriormente.
9. Ressuspender as células em 300  $\mu$ L de 50 mM  $\text{CaCl}_2$ .
10. Manter em banho de gelo por 20 min.
11. Aliquotar 50  $\mu$ L de células competentes em microtubos e estocar a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### Transformação

1. Adicionar 3  $\mu$ L do produto da ligação a 50  $\mu$ L de células competentes e colocar em banho de gelo por 20 min.
2. Incubar a mistura por 2 min a  $42^\circ\text{C}$  em banho-maria.
3. Transferir imediatamente para banho de gelo por 5 min.
4. Adicionar 1 mL de LB líquido e incubar por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação (180 rpm).
5. Centrifugar a 5.000 rpm/10 min.
6. Descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender o sedimento em 100  $\mu$ L de LB líquido.
8. Semear em duas placas com LB sólido, contendo 75  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina, com o auxílio da alça de *Drigalsk*.
9. Incubar em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 - 48 h.

#### Extração do plasmídeo

1. Em um tubo contendo 5 mL de meio LB líquido adicionar ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ).
2. Com o auxílio de uma haste esterilizada adicionar uma colônia de bactérias características no tubo.
3. Incubar sob agitação (180 rpm) a  $37^\circ\text{C}/24$  h.
4. Transferir 1,5 mL da cultura em um microtubo e centrifugar a 5.000 x g/12 min. Descartar o sobrenadante. Repetir o procedimento.
5. Adicionar 250  $\mu$ L de *Resuspension buffer* (R3) com RNase A ao sedimento de células. Homogeneizar para ressuspender as células.
6. Adicionar 250  $\mu$ L de *Lysis buffer* (L7) para lisar as células e inverter o microtubo gentilmente por cinco vezes. Incubar em temperatura ambiente por 5 min.

7. Adicionar 350  $\mu\text{L}$  de *Precipitation buffer* (N4) para precipitar e inverter gentilmente cinco vezes ou até ficar homogêneo. Centrifugar o lisado a 12.000 x g/10 min.
8. Transferir o sobrenadante para um tubo coletor de 2 mL com coluna e centrifugar a 12.000 x g/1 min. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo e repetir a centrifugação.
9. Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer* (W9 - tampão de lavagem com etanol) no centro da coluna.
10. Centrifugar a 12.000 x g/1 min, descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo e repetir a centrifugação.
11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
12. Adicionar 75  $\mu\text{L}$  de *TE Buffer* (TE) no centro da coluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
13. Centrifugar a 12.000 x g/2 min.
14. Estocar o plasmídeo de DNA purificado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

• **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.

- **Isolamento de Rotavirus B em cultivo celular**

1. Células

- Preparar células MA-104 em garrafas (25 mL) 24 h antes da inoculação do material (inóculo).
- Preparar garrafas extras para utilizar como controles.

2. Preparo do material a ser inoculado (inóculo).

Amostras de fezes

- 100 µL de fezes.
- 900 µL de PBS.
- Homogeneizar em vórtex.
- Centrifugar a 1000 rpm (baixa rotação)/5 min.
- 500 µL do sobrenadante + 500 µL de DMEM (sem SFB) + 50 µL de Anti-Anti 100X (antibiótico e antifúngico - Gibco®).
- Adicionar ao inóculo 10 µg/ml de tripsina e incubar a 37°C por 30min
- Utilizar 1 mL para inoculação.

3. Adsorção

- 1 mL do material previamente preparado (tratamento com antibiótico e tripsina)
- Remover o meio das garrafas com células.
- Lavar garrafa 3X com PBS.
- Adicionar 1 mL do inóculo em garrafa contendo monocamada de cultivo de célula MA-104 mantida sob condição estacionária.
- Incubar em agitação em estufa a 37°C/3 h a 5% de CO<sub>2</sub> controlado.
- Lavar garrafa 3X com PBS.
- Adicionar 10 mL de meio DMEM sem SFB e suplementado com 0.5 µg/ml de tripsina e 3X de Anti-Anti (Gibco®).
- Incubar em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e monitorar diariamente para a presença de efeito citopático (ECP).
- Caso não ocorra ECP, incubar por até 7 dias, congelar a -80°C, descongelar a 37°C e utilizar 1 mL do sobrenadante para inocular outras garrafas com cultivos celulares de MA-104 (passagens cegas).

- **Microscopia eletrônica de transmissão**

1. Preparo da suspensão fecal

- 50 µL de fezes.
- 500 µL de PBS.

- Homogeneizar em vórtex.
- Centrifugar a 1500 xg/30 min.

## 2. Microscopia eletrônica

- Adicionar uma gota de 5  $\mu$ L da suspensão em uma grade de cobre de 300 mesh revestida por filme formvar
- Corar negativamente com solução de ácido fosfotungstico 3% por 90 s
- Examinar a 80 kV sob microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai-G2).

## ANEXO D - Lista de softwares

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3  
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- MEGA package software version 7  
(<http://www.megasoftware.net>)
- BioEdit software version 7.1.11  
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)