



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANE RIBEIRO

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DE INFECÇÕES
SINTOMÁTICAS POR *KOBUVIRUS* EM ANIMAIS**

Londrina
2017

JULIANE RIBEIRO

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DE INFECÇÕES
SINTOMÁTICAS POR *KOBUVIRUS* EM ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito parcial para à obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2017

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

Ribeiro, Juliane.

ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DE INFECÇÕES SINTOMÁTICAS POR KOBUVIRUS EM ANIMAIS / Juliane Ribeiro. - Londrina, 2017.
80 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Bezerra - Tese. 2. Cão - Tese. 3. Kobuvírus - Tese. 4. Coinfecção - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

JULIANE RIBEIRO

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DE INFECÇÕES
SINTOMÁTICAS POR *KOBUVIRUS* EM ANIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr.^a. Alice Ferandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr.^a. Marlise Pompeo Claus
Instituto Federal Catarinense - UEL

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

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

Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de abril de 2017.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal (LabVir) e no Laboratório Multiusuário em Saúde Animal, Unidade de Biologia Molecular (LAMSA / BIOMOL), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

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

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**

- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**

- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**

- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça em conquistar mais esse desafio.

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

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

A todos da minha família, meu pai José Carlos (*in memorian*), mãe Maria Aparecida, irmãos José e Joseane e aos sobrinhos Julia e João Carlos. Muito obrigada pelo apoio e por acreditar nesse sonho junto comigo.

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

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

Aos funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG).

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

A todos os funcionários do Laboratório de Virologia Animal, estagiários e alunos da pós-graduação. Muito obrigada pela companhia, parceria e por dividirem comigo os momentos bons e também os frustrantes da pesquisa.

Muito obrigada.

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

a VONTADE”

Albert Einstein

RIBEIRO, Juliane. **Aspectos clínicos e moleculares de infecções sintomáticas por kobuvirus em animais**. 2017. 80. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O gênero *Kobuvirus*, membro da família *Picornaviridae*, é dividido em seis espécies *Aichivirus A a F*. O segmento 3D do genoma do *Kobuvirus* é uma região conservada, que codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), que é amplamente utilizada para o diagnóstico do vírus. A região genômica que codifica a proteína VP1 do capsídeo viral, região mais variável, é utilizada para estudos filogenéticos em cepas de campo de kobuvírus. Kobuvírus tem sido relacionado à diarreia, principalmente em animais jovens e a infecção por kobuvírus ainda é pouco descrita em animais no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar características da infecção em duas espécies animais sendo um animal de produção e outro de estimação. O primeiro estudo descreve o envolvimento do kobuvírus (*Aichivirus B*) em um surto de diarreia em bezerros de um rebanho leiteiro de alta produção. Vinte e quatro amostras fecais diarreicas de bezerros com até 30 dias de idade foram coletadas para análise virológica. Cinco amostras fecais de bezerros assintomáticos foram incluídas nas análises como grupo controle. Utilizando ensaios de RT-PCR, o aichivírus B foi detectado em 54,2% (13/24) e rotavírus A G10P[11] em 25% (6/24) das amostras fecais diarreicas avaliadas. Os bezerros assintomáticos foram negativos para ambos os vírus. Aichivírus B foi identificado apenas em bezerros com até duas semanas de idade com 83,3% (10/12) das amostras positivas. A análise filogenética baseada no gene RdRP agrupou as cepas brasileiras em um novo ramo no *cluster Aichivirus B*. A análise das sequências de nucleotídeos do gene VP1 das cepas brasileiras e chinesas de *Aichivirus B* permitiu classificar as cepas brasileiras avaliadas na recém proposta, linhagem 1 (genótipo A). Este é o primeiro relato de alta taxa de detecção de aichivírus B em um surto de diarreia em bezerros leiteiros e também o primeiro estudo filogenético com base no gene VP1 realizado com cepas de campo de *Aichivirus B* identificadas na América do Sul. O segundo estudo descreve a detecção extra-intestinal de kobuvírus canino (CaKV) em um filhote de Chihuahua de 5 meses de idade com histórico clínico de fezes com sangue de morte natural. Fragmentos de tecido foram submetidos à técnica de histopatologia e imuno-histoquímica (IHC) para identificar antígenos do vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) e adenovírus canino tipos 1 e 2 (CAAdV-1 e 2). As técnicas de PCR e RT-PCR foram utilizadas para amplificar genes específicos de CaKV, CDV, CPV-2, CAAdV-1 e -2 e herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1). Fragmentos de intestino e amostras de fezes foram avaliados para identificar a presença de rotavírus. As principais alterações patológicas encontradas foram pneumonia intersticial, bronquite necrosante, miocardite, enterite e depleção linfóide. A RT-PCR detectou CaKV no cerebelo, cérebro, pulmão, tonsila e fígado. Neste estudo, também foram identificadas infecções mistas de CaKV com CDV e CPV-2 com CaHV-1. CaKV e rotavírus não foram identificados nas fezes e intestino. Os ensaios IHC detectaram antígenos de CDV e CAAdV-1 em regiões distintas dos pulmões. A análise filogenética da cepa de CaKV identificada neste estudo revelou semelhança com cepas detectadas em outros países. Os resultados evidenciam a primeira detecção extra-intestinal de CaKV em tecidos em associação com infecções mistas com outros vírus comumente encontrados em cães e a primeira detecção extra-intestinal de CaKV em um cão. Os resultados obtidos nesse estudo adicionaram novos conhecimentos sobre aspectos clínicos e moleculares da infecção por kobuvírus em animais.

Palavras-chave: Bezerro. Cão. *Aichivirus B*. Vírus entérico. Coinfecção.

RIBEIRO, Juliane. **Clinical and molecular aspects of symptomatic kobuvirus infections in animals.** 2017. 80. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The *Kobuvirus* genus is a member of the *Picornaviridae* family and subdivided into six species *Aichivirus A* to *F*. The 3D segment of the *Kobuvirus* genome is a conserved genomic region which encodes the enzyme RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) and widely used for the virus diagnosis. The region encoding the protein VP1 of the viral capsid, region more variable, is used to perform phylogenetic studies in kobuvirus field strains. Kobuvirus has been related with diarrhea mainly in young animals and the kobuvirus infection is still little described in animals in Brazil. This study aimed to evaluate characteristics of the infection in two animal species being one of production and another pet. The first study describes the involvement of kobuvirus (*Aichivirus B*) in a diarrhea outbreak in calves of a high-producing dairy cattle herd. Twenty-four diarrheic fecal samples from calves with up to 30 days old were collected for virological analysis. As control group were collected five fecal samples from asymptomatic calves. Using RT-PCR assays aichivirus B was detected in 54.2% (13/24) and rotavirus A G10P[11] genotypes in 25% (6/24) of diarrheic fecal samples evaluated. Asymptomatic calves were negative for both viruses. Aichivirus B was only identified in calves with up to two weeks old with 83.3% (10/12) of the positive samples. Phylogenetic analysis based on the RdRP gene the Brazilian strains grouped in a new branch within the *Aichivirus B* cluster. The analysis of the nucleotide sequences of the VP1 gene of the Brazilian and Chinese *Aichivirus B* strains allowed classified the Brazilian field strains in the putative lineage 1 (genotype A). This is the first report of the high detection rate of aichivirus B in a diarrhea outbreak in dairy calves and also the first phylogenetic study based in VP1 gene of Aichivirus B wild-type strains in South America. The second study describes the extra-intestinal detection of kobuvirus canino (CaKV) in a Chihuahua 5-month-old puppy, with clinical history of bloody-tinged feces of natural death. Tissue fragments were submitted to technique histopathology, and immunohistochemical (IHC) assays to identify the antigens of canine distemper virus (CDV), canine parvovirus-2 (CPV-2), and canine adenovirus types 1 and 2 (CAV-1 and -2). PCR and RT-PCR assays targeted specific genes of CaKV, CDV, CPV-2, CAV-1 and -2, and canine herpesvirus-1 (CaHV-1). Intestinal fragments and fecal samples were evaluated to identify the presence of rotavirus. The main pathological findings were interstitial pneumonia, necrotizing bronchitis, and myocarditis, enteritis, and lymphoid depletion. The RT-PCR detected CaKV within the cerebellum, cerebrum, lung, tonsil, and liver. Mixed infections of CaKV with CDV, CPV-2, and CaHV-1 were identified by molecular assays. CaKV and RV were not identified within the feces and intestine. IHC assays detected antigens of CDV and CAV-1 within distinct regions of the lungs. Phylogenetic analysis of the CaKV strains identified in this study was similar to those strains from other geographical regions. The results confirmed the first extra-intestinal detection of CaKV in tissues in association with mixed infections with others viruses commonly found in dogs and the first extra-intestinal detection of CaKV in a dog. The results obtained in this study added new knowledge of clinical and molecular aspects of kobuvirus infection in animals.

Key words: Calf. Puppy. *Aichivirus B*. Enteric virus. Coinfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

- Figura 1** – Organização genômica do gênero *kobuvirus*21
- Figura 2** – Árvore filogenética contendo as espécies que compõem o gênero *Kobuvirus*. Análise filogenética com 507 pb com base no segmento 3C/3D pelo método de *neighbor-joining*, modelo *Kimura 2-parameter*, *bootstrap* de 1000 replicações no programa MEGA versão 6.0. Cepa do vírus da Febre Aftosa (*outgroup*).22
- Figura 3** – Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de partículas de kobuvírus.....23
- 4.1 Artigo A -Phylogenetic analysis of VP1 and RdRP genes of Aichivirus B Brazilian strains involved in a diarrhea outbreak in dairy calves**
- Figure 1** – Phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence (551 bp) of the RdRP gene (A) and partial region of VP1 gene (535 bp) (B) of Brazilian *Aichivirus B* strains. The tree was generated using the neighbor-joining method and Kimura 2-parameter as the nucleotide substitution model. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70% are shown. The *Aichivirus B* strains identified in this study are marked with a filled circle51
- 4.2 Artigo B -Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil**
- Fig1** – Immunohistochemical demonstration of the antigens of canine adenovirus-1 (A) and canine distemper virus (B) in the lung of a puppy infected with canine kobuvirus. Immunoperoxidase; Bar=10 µm.60
- Fig2** – Phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence (nt 201) of the RdRp gene (a) and partial region of VP1 protein (nt 303) of canine kobuvirus (CaKV) (b). The tree was generated using the neighbor-joining method and Kimura 2-parameter as the nucleotide substitution model. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70% are shown. The strains of CaKV identified during this study are marked with a filled circle61

LISTA DE TABELAS

4.1 Artigo A - Phylogenetic analysis of VP1 and RdRP genes of *Aichivirus B* Brazilian strains involved in a diarrhea outbreak in dairy calves

Table 1 –	Distribution of <i>Aichivirus B</i> positive fecal samples according to the age of calves identified in a neonatal diarrhea outbreak in a dairy cattle herd, Brazil	51
------------------	---	----

4.2 Artigo B - Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil

Table 1 –	Detection of viral nucleic acids amplified from multiple tissues and the feces of a diarrheic dog	60
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCoV	Coronavírus bovino
CaKV	Kobuvírus canino
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
nt	Nucleotídeos
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	Fase aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
RdRP	RNA dependente de RNA polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Transcrição reversa
TCID	<i>Tissue culture infective dose</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Piconarvirus	20
2.2	Aichivirus B (kobuvírus bovino).....	26
2.3	Kobuvirus canino (CaKV)	29
	REFERÊNCIAS	32
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	ARTIGOS	44
4.1	ARTIGO A –Phylogenetic analysis of VP1 and RdRP genes of Aichivirus B Brazilian strains involved in a diarrhea outbreak in dairy calves	45
	Abstract	46
1	Introduction	47
2	Materials and Methods	48
	Study location and clinical history	48
	Fecal samples.....	49
	Nucleic acid extraction	49
	Virological analysis	49
	Sequence analysis	49
3	Results	50
4	Discussion	52
	Conflict of interest	54
	Acknowledgements	54
	References	54

4.2	ARTIGO B – Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil.	57
	Abstract	58
	References	62
5	CONCLUSÕES	65
	ANEXOS	67
	ANEXO A - Lista de Reagentes	68
	ANEXO B - Soluções e Tampões	70
	ANEXO C - Protocolo de Técnicas	72
	ANEXO D - Lista de Softwares	79
	ANEXO E - Normas do periódico Virus Genes para formatação de trabalho	80

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O viroma é constituído por vírus que infectam células eucarióticas e bacteriófagos (HANDLEY, 2016). Dessa forma, viroma intestinal é um coletivo de todos os vírus que habitam o intestino. A estreita relação entre micro-organismos presentes no intestino, como as bactérias, fungos, vírus e protozoários, constituem o microbioma intestinal (HANDLEY, 2016).

O microbioma intestinal dos vertebrados desempenha função fundamental na saúde do hospedeiro, estimulando o desenvolvimento do sistema imunológico, na fisiologia, auxiliando na degradação e absorção de nutrientes e no equilíbrio com os agentes patogênicos oportunistas (CHOW et al., 2010).

O desenvolvimento de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração, resultam em uma série de estudos que avaliam a diversidade de espécies e as estruturas desses micro-organismos que habitam o ambiente intestinal tendo como principal objetivo o aumento da eficiência alimentar e a redução da suscetibilidade à doenças que alteram a homeostasia do organismo (HANDLEY, 2016).

O desvendamento de simbioses micróbio-hospedeiro e a identificação de funções básicas do microbioma são questões essenciais para que possam ser usufruídos os benefícios de um microbioma equilibrado para a saúde e produção animal.

A maioria das zoonoses emergentes é originária de animais selvagens, e muitas delas são causadas por vírus. Entretanto, a diversidade viral total (*virodiversity*) é impossível de ser estimada (ANTHONY et al., 2013). O surgimento de novos vírus e a diversidade genética no ambiente selvagem pode levar ao aumento de doenças emergentes de etiologia viral (JONES et al., 2008; ANTHONY et al., 2013).

A identificação de micro-organismos coinfectando um hospedeiro é importante porque essas interações podem ser associações positivas ou negativas, tanto entre as espécies que habitam o intestino, quanto para o hospedeiro (JONES et al., 2008; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Alterações microbiológicas de organismos comensais ou patogênicos no intestino podem interferir na resposta imune do hospedeiro (HANDLEY, 2016). Dessa forma, distúrbios da microbiota resultam no desequilíbrio de células imunes adaptativas podendo

estar relacionado a distúrbios como a doença inflamatória intestinal e extra-intestinal (ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Alguns fatores predisponentes e determinantes podem facilitar a entrada e a disseminação dos micro-organismos no animal nos primeiros dias de idade (RIEDER; BRUM, 2007). Os custos com o tratamento, os reflexos negativos na performance do animal e os altos índices de mortalidade são fatores importantes que devem ser considerados para o controle e a profilaxia das enterites de origem infecciosa (ALFIERI et al., 2006).

Alguns fatores como o fornecimento de promotores de resposta imune, como a utilização de vacina nas fêmeas no final do período gestacional, o fornecimento de colostro em qualidade e quantidade adequadas, aliado às condições de higiene das instalações são fundamentais para a prevenção da diarreia neonatal (BARTELS et al., 2010).

Adicionalmente, ações de manejo que auxiliem no controle das condições estressantes para o animal, tais como variações bruscas de temperatura, privação de alimento e água são fundamentais para a qualidade de vida dos animais, prevenindo as alterações de homeostase.

A diarreia neonatal é a doença entérica que merece destaque em diversas espécies de animais de produção como nos animais de companhia. Vários estudos conduzidos no Brasil e em todo o mundo relacionam a presença de patógenos destacando entre eles bactérias (*Escherichia coli enteropatogênica*, *Salmonella* spp.), vírus (rotavírus, coronavírus, norovírus, parvovírus), toxinas (fungos produtores de micotoxinas) e protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp.). Esses micro-organismos, entre muitos outros, são responsáveis por infecções entéricas que culminam com a síndrome diarreica em animais neonatos. Esses potenciais enteropatógenos podem atuar isoladamente, em infecções singulares, ou em associação, que resulta em infecções mistas entre micro-organismos patogênicos pertencentes à mesma classe ou até mesmo entre classes distintas de micro-organismos (ALFIERI et al., 2006; HEADLEY et al., 2015; ABUELO, 2016).

Atualmente, diferentes vírus RNA e DNA são regularmente descritos em conteúdo intestinal de animais assintomáticos e também em animais com sinais clínicos de diarreia. Porém, como os relatos são ainda relativamente recentes o potencial enteropatógeno da maioria desses vírus ainda não foi adequadamente avaliado.

Kobuvírus é um agente viral descrito em um surto de infecção entérica em humanos, em 1991 no Japão (YAMASHITA et al., 1991). A partir desse relato o kobuvírus vem sendo estudado em vários países e identificado, além dos humanos, também em várias espécies de animais domésticos e selvagens (BARRY et al., 2011; KAPOOR et al., 2011; CHUNG et al., 2013; OLARTE-CASTILLO et al., 2015).

Muitos estudos relacionam a presença de kobuvírus em animais e humanos com sinal clínico de diarreia (RIBEIRO et al., 2014; CANDIDO et al., 2017). Entretanto, esse agente viral também pode ser encontrado nas fezes de animais assintomáticos, porém com menor frequência (YAMASHITA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2014).

O desenvolvimento de estudos abordando a infecção por kobuvírus em diversas espécies animais é importante para a compreensão da epidemiologia, patogenia, bem como a interação com outros micro-organismos entéricos. Adicionalmente, outro aspecto ainda obscuro na epidemiologia dos kobuvírus em animais e de extrema importância que seja rapidamente esclarecido é o risco do potencial zoonótico dessa infecção viral. A estreita relação entre os prováveis hospedeiros do kobuvírus como humanos, animais de produção e de companhia não permite que esse risco biológico seja negligenciado. Com isto, métodos de virologia clássica e molecular devem ser empregados na busca de respostas a vários questionamentos ainda não esclarecidos com relação à infecção por esse vírus, tanto em seres humanos, quanto em animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Picornavírus

Picornavírus pertencem à ordem *Picornavirales* que é composta por cinco famílias e 47 gêneros podendo causar infecção em plantas e animais, incluindo o homem (KEMPF; BARTON, 2015; ICTV, 2016). O termo “*picornavirus*” é derivado do grego “pico RNA” que “significa pequeno RNA vírus”, dessa forma o nome dessa família viral é caracterizado pelo pequeno tamanho do vírion (ICTV, 2016).

Os picornavírus ocasionam enfermidades de origem respiratória, hepática, cardíaca, neurológica, mucocutânea e doenças sistêmicas com diferentes níveis de gravidade (RIEDER; BRUM, 2007). Em Medicina Veterinária, existem doenças importantes que são causadas por membros desta família, destacando-se a febre aftosa que é considerada pela OIE, como uma doença altamente contagiosa de grande impacto econômico com efeitos devastadores na produção animal (GOODWIN et al., 2009; OIE, 2016).

Morfológicamente, os vírus da família *Picornaviridae* são esféricos, desprovidos de envelope lipoprotéico e apresentam 27 a 30 nm de diâmetro. O genoma é constituído por RNA fita simples (ssRNA) com polaridade positiva, poliadenilado na extremidade 3' e com 8,2 - 8,4 kilobase de tamanho (YAMASHITA et al., 1998).

A organização viral típica dos picornavírus apresenta uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5'UTR com a função de regular a síntese de RNA viral; cada fase aberta de leitura (ORF) do genoma viral codifica múltiplos domínios que são expressos em uma poliproteína (proteína Líder – L), que é clivada em três proteínas precursoras P1, P2 e P3 e processada por proteinases originando as proteínas individuais do vírion; três proteínas estruturais do capsídeo (VP0, VP3 e VP1) e sete proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D); além da extremidade 3'UTR (YAMASHITA et al., 1998; RIEDER; BRUM, 2007) (Figura 1).

O segmento que codifica a região não estrutural 3D é a região mais conservada do genoma viral e codifica a polimerase viral (RNA polimerase dependente de RNA - RdRP). A proteína VP1 constitui a região mais externa do capsídeo viral, é considerada uma região imunogênica importante e também a proteína mais variável da partícula viral (REUTER; BOLDIZSAR; PANKOVICS, 2009).

Atualmente o gênero *Kobuvirus*, inserido na família *Picornaviridae*, é considerado em várias partes do mundo um gênero viral emergente causando infecções em humanos e animais (LI et al., 2011; PORTES et al., 2016). O gênero *Kobuvirus* é dividido em seis espécies (ICTV, 2016); *Aichivirus A* que tem como hospedeiros os seres humanos, felinos, caninos e roedores (OLARTE-CASTILLO et al., 2015); o *Aichivirus B* responsável por ocasionar infecção em bovinos e ovinos (REUTER et al., 2010); a terceira espécie, o *Aichivirus C*, identificado em infecções em suínos e caprinos; o *Aichivirus D* tem como hospedeiro bovinos (cepa variante isolada na cidade de Kagoshima, Japão) (OTOMARU et al., 2016); *Aichivirus E* que foi identificado em coelhos (*Oryctolagus cuniculus var. domestica*) (PANKOVICS et al., 2016) e a sexta espécie o *Aichivirus F* encontrada em morcegos, até o momento não publicado (Figura 2).

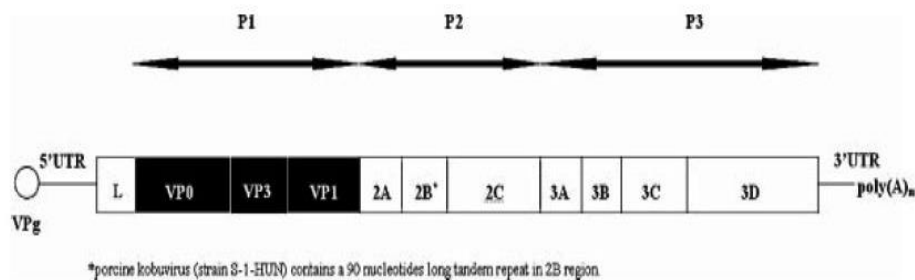


Figura 1. Organização genômica do gênero kobuvírus.

Fonte: Reuter et al. (2011).

As principais diferenças do kobuvírus em relação aos outros picornavírus encontram-se na região genômica que codifica proteína L onde observa-se a ausência de um sítio de clivagem na região VP0 e uma forma distinta da proteína 2A (REUTER; BOROS; PANKOVICS, 2011).

A palavra “*Aichivirus*” é de origem japonesa, recebendo esse nome porque as partículas virais foram isoladas em células Vero pela primeira vez, em 1989, em um surto de gastroenterite em humanos na cidade de Aichi, no Japão (YAMASHITA et al., 1991). A partir desse isolamento foi visualizado um novo vírus citopático atípico, com organização semelhante aos picornavírus, sendo classificado como novo membro da família *Picornaviridae*, demonstrado na figura 3 (YAMASHITA et al., 1991).

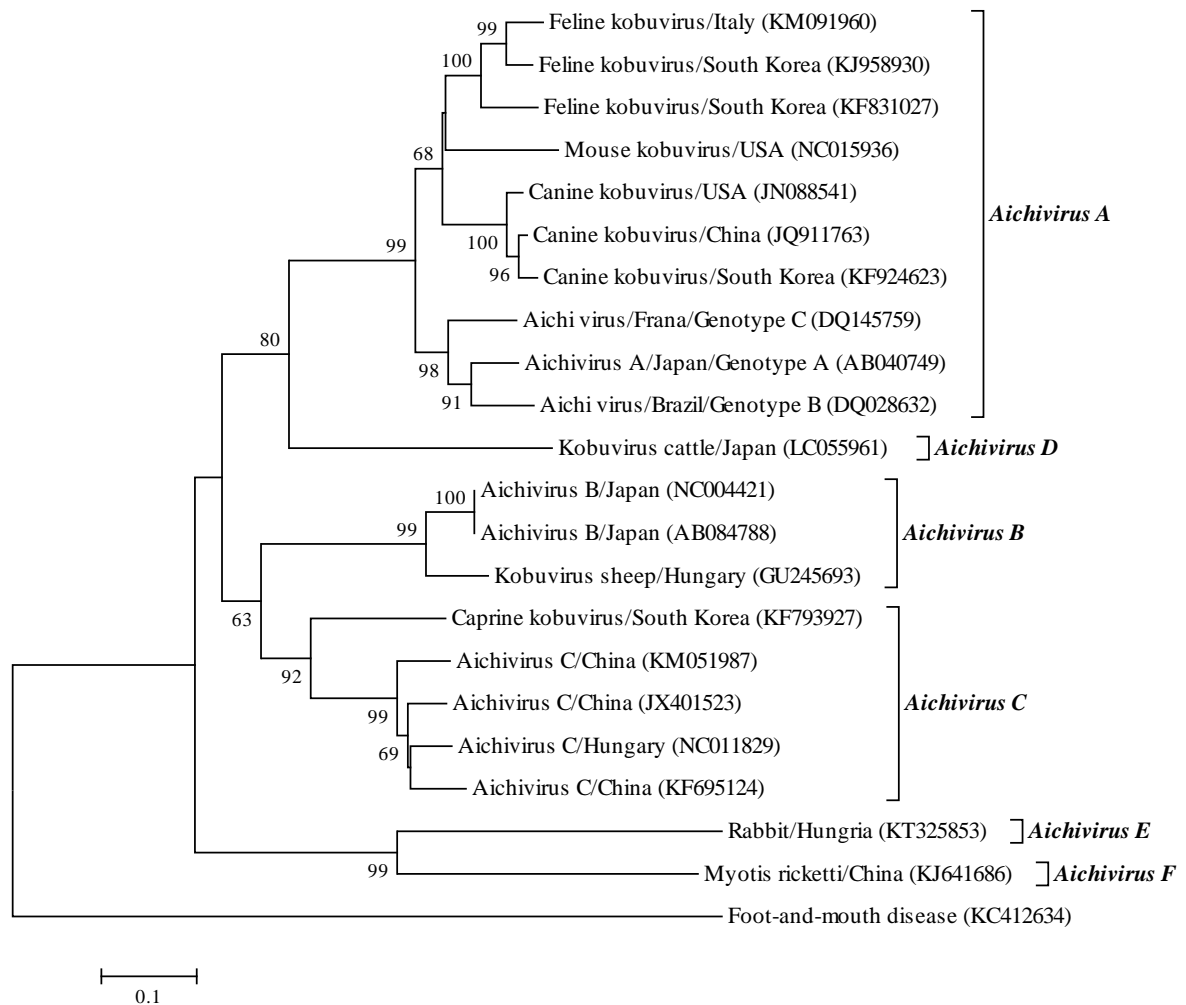


Figura 2. Árvore filogenética contendo as espécies que compõem o gênero *Kobuvirus*. Análise filogenética com 507 pb com base no segmento 3C/3D pelo método de *neighbor-joining*, modelo *Kimura 2-parameter*, *bootstrap* de 1000 replicações no programa MEGA versão 6.0. Cepa do vírus da Febre Aftosa (*outgroup*).

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dessa descoberta, o *Aichivirus A* foi descrito em vários países (OH et al., 2006; DREXLER et al., 2011) e por meio de análises filogenéticas com base no segmento que codifica a região genômica 3C/3D da polimerase viral, é dividido em três genótipos, denominados A, B e C, que apresentam até 90% de identidade de nucleotídeos (nt), entre elas, nessa região genômica (YAMASHITA et al., 2000; AMBERT-BALAY et al., 2008). Sendo confirmado por análise da região codificante da proteína VP1.

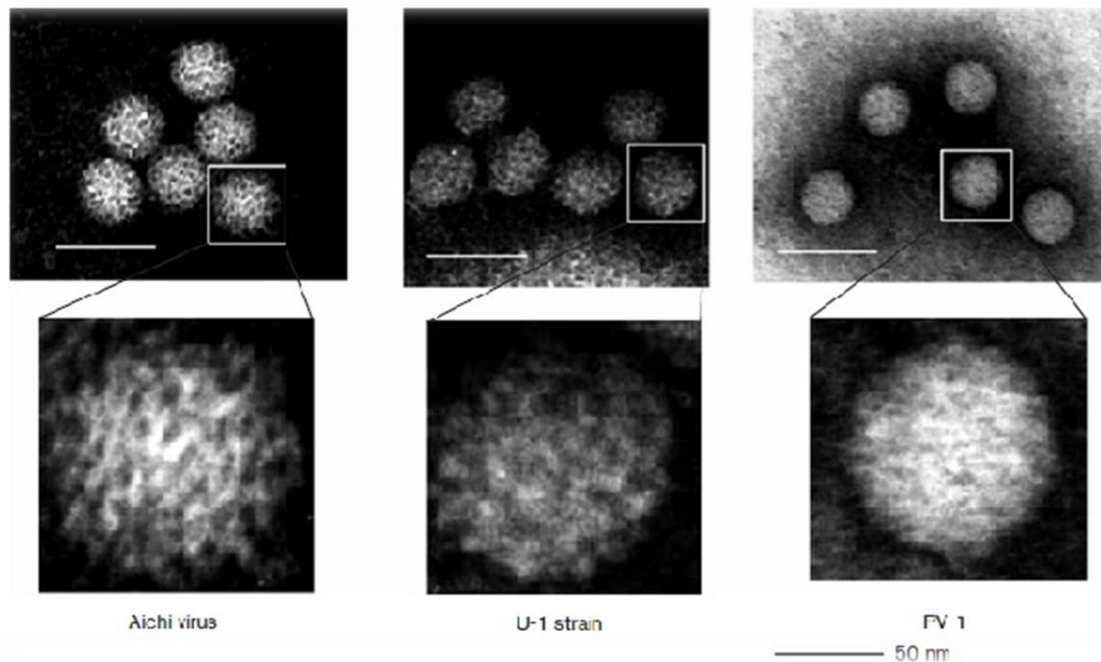


Figura 3. Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de partículas de kobuvírus.
Fonte: Yamashita et al. (2003).

Os relatos de identificação de aichivírus A estão concentrados principalmente em amostras fecais de humanos com gastroenterite (AMBERT-BALAY et al., 2008; CHITAMBAR; GOPALKRISHNA, 2011). Na Hungria, o vírus foi identificado em uma (1,5%) amostra fecal em um grupo de crianças hospitalizadas ($n=65$) (REUTER et al., 2009). Resultado semelhante foi descrito na China onde 1,8% (8/445) das amostras fecais de crianças de 0 a 6 anos de idade, foram positivas para o aichivírus A (YANG et al., 2009).

Na Índia, um estudo retrospectivo de 5 anos realizado em amostras fecais de 1240 pacientes com até oito anos de idade com diarreia revelou que 1,1% (14/1240) das amostras foram positivas para o aichivírus A (VERMA; CHITAMBAR; GOPALKRISHNA, 2011). Todas as cepas de Aichivírus A identificadas neste estudo pertenciam ao genótipo B (VERMA; CHITAMBAR; GOPALKRISHNA, 2011).

No Brasil, a primeira identificação de aichivírus A ocorreu em 2006 no estado de Goiás em pacientes hospitalizados com sinal clínico de gastroenterite. As cepas de *Aichivirus A* encontradas no Brasil foram classificadas no genótipo B (OH et al., 2006).

O envolvimento do kobuvírus como um patógeno gastroentérico em humanos ainda é uma questão não definida. Estudos relacionam a presença do aichivírus em humanos e animais em coinfeção com outros vírus, sendo o rotavírus (AMBERT-BALAY et al., 2008; VERMA; CHITAMBAR; GOPALKRISHNA, 2011; RIBEIRO et al., 2014) e os

norovírus (OH et al., 2006; MAUROY et al., 2009) os agentes virais mais detectados em infecção mista.

Entretanto, o aichivírus A também foi encontrado em associação com outros vírus indutores de imunossupressão, como o retrovírus (PORTES et al., 2015). Em um estudo, a presença do kobuvírus foi relatada com maior frequência (7,32%; 9/123) em pacientes HIV-soropositivos com gastroenterite em comparação aos pacientes com diarreia e HIV-soronegativos (0,8%; 1/125). Ainda nesse estudo as cepas de *Aichivirus A* identificadas foram classificadas nos genotipos A e B. Os autores concluíram que o aichivírus A pode ser classificado como um patógeno oportunista em pacientes com doença entérica (PORTES et al., 2015).

Adicionalmente, estudos de soroprevalência de aichivírus A demonstraram a presença de 25% de soropositivos em indivíduos com idade superior a 7 meses (GOYER et al., 2008) e de até 95% em indivíduos com idade acima de 30 anos (RIBES et al., 2010). Segundo um inquérito soropidemiológico realizado no Japão as maiores taxas de soroconversão foram encontradas na faixa etária entre 20 até 40 anos (YAMASHITA et al., 1993).

As altas taxas de indivíduos soropositivos à infecção pelo aichivírus A sugerem que o vírus pode circular no organismo sem causar sintomas ou ocasionar infecções não perceptíveis, que não necessitem de intervenção médica (JONSSON et al., 2012).

Em relação aos animais, os aichivírus foram descritos em espécies de animais domésticos e silvestres em vários países (DUFKOVA et al., 2013; CHOI et al., 2015; OLARTE-CASTILLO et al., 2015). Até o momento, em nenhuma espécie os sinais clínicos são confirmados pela presença do vírus (DUFKOVA et al., 2013).

Em um estudo experimental foi inoculado por via intramuscular 2 mL (10^7 TCID₅₀/mL) de inóculo viral utilizando 20 suínos livre de patógenos. A partir do quarto dia após a inoculação os animais apresentaram alterações clínicas como diarreia, náusea e edema, sendo que após o oitavo dia da inoculação os sinais clínicos desapareceram. Durante a necropsia foi observado hemorragia petequial na superfície dos rins. No sexto dia após inoculação 2 animais morreram. A avaliação histológica dos pulmões desses dois animais apresentaram exsudato nos alvéolos, tecido intersticial pulmonar mais denso e congestionado, sugerindo pneumonia intersticial. Além disso, os rins continham grande quantidade de glóbulos vermelhos e células epiteliais tubulares exsudadas nos túbulos renais, sugerindo hemorragia petequial. Adicionalmente, foram encontradas numerosas células caliciformes no ceco, com grande quantidade de linfócitos infiltrados na mucosa do reto, caracterizando uma

inflamação. Na opinião dos autores, a resposta inflamatória seria a causa da diarreia nos animais (Yang et al., 2015).

As taxas de diagnóstico do vírus em animais aparentemente saudáveis (assintomáticos) comparadas com as encontradas em animais com sinais clínicos de diarreia (sintomáticos) em alguns estudos são semelhantes (VERMA; CHITAMBAR; GOPALKRISHNA, 2011; DI MARTINO et al., 2012). Entretanto, outros estudos relacionam maior taxa de infecção em animais com diarreia em relação aos animais assintomáticos (PARK et al., 2010; JEOUNG et al., 2011).

Da mesma forma não está claro sobre a superinfecção do aichivírus com outros agentes patogênicos, na qual a presença desse vírus causaria o agravamento dos sinais clínicos ou seria o responsável por causar uma doença multifatorial. Como já comprovado, presença do vírus nas fezes e no soro dos animais demonstra a capacidade desse vírus em se disseminar no organismo animal. Além disso, condições estressantes poderiam facilitar a infecção por alterar a imunidade para os microrganismos potencialmente patogênicos (BARRY et al., 2011).

Assim como em humanos, os resultados dos estudos revelaram que a presença do kobuvírus é relatada com maior frequência em animais jovens (JEOUNG et al., 2011; RIBEIRO et al., 2014). No entanto, há o relato da frequência de 90,9% (30/33) de amostras fecais aichivírus-positivas em suínos adultos (DUFKOVA et al., 2013).

As formas de contaminação pelas vias direta e indireta (por meio de água, alimentos ou fômites contaminados) estão sendo investigadas como possibilidades de vias de transmissão. No caso dos humanos, é descrito a via oral-fecal como a principal via de transmissão (REUTER; KECSKEMETI; PANKOVICS, 2010).

Em todo o mundo, estudos recentes demonstram a amplitude de espécies animais susceptíveis à infecção pelo kobuvírus, tais como raposas (*Vulpes vulpes*), cervídeos (*Capreolus capreolus*) (DI MARTINO et al., 2015), roedores (*Peromyscus crinitus*, *Peromyscus maniculatus*, *Peromyscus truei* e *Peromyscus boylii*) (PHAN et al., 2011), aves (*Coracias garrulus*) (PANKOVICS et al., 2015) e carnívoros selvagens (*Neovison vison*, *Mustela lutreola*, *Golden jackal* e *Side striped jackal*) (BODEWES et al., 2014; OLARTE-CASTILLO et al., 2015). Adicionalmente, a presença desse agente viral tem sido amplamente relatada em espécies de animais de produção como suínos (RIBEIRO et al., 2013) e bovinos (RIBEIRO et al., 2014), além de animais de companhia como caninos e felinos (CARMONA-VICENTE et al., 2013).

Até o momento, a transmissão interespécies pelo kobuvírus, não foi descrita. Com isso, novos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre as cepas virais circulantes, sua manifestação no organismo, formas de transmissão do vírus e sua distribuição global (DUFKOVA et al., 2013).

Com relação à infecção, o conhecimento sobre a transmissão interespécie é um fator importante que deve ser investigado pois esse agente viral está sendo encontrado tanto em animais quanto em humanos e pode representar risco para a saúde pública (KHAMRIN et al., 2010; DUFKOVA et al., 2013).

2.2 *Aichivirus B* (kobuvírus bovino)

kobuvírus bovino, atualmente denominado *Aichivirus B* (ICTV, 2016), foi descrito pela primeira vez em bovinos no Japão em 2003 (YAMASHITA et al., 2003), como um agente citopático em cultura de células Vero a partir de um meio suplementado com soro fetal bovino. Este soro era suspeito de estar contaminado com o aichivírus. Morfologicamente, a partícula viral identificada apresentava semelhança com os aichivírus encontrados nos humanos, porém os vírus eram geneticamente distintos (YAMASHITA et al., 2003).

Um estudo realizado com 72 amostras de soro de um rebanho bovino assintomático identificou anticorpos contra o aichivírus B (U-I) em 59,7% (43/72) dos animais avaliados (YAMASHITA et al., 2003). Paralelamente, foram analisadas por RT-PCR 72 amostras de fezes do mesmo rebanho sendo que o RNA do aichivírus B foi identificado em 16,7% (12/72) das amostras. Os autores concluíram que o aichivírus B é um vírus presente em rebanhos bovinos do Japão (YAMASHITA et al., 2003).

Posteriormente, um estudo retrospectivo avaliou amostras de fezes de bovinos com diarreia do período de 2001 a 2004 na Tailândia. *Aichivirus B* foi identificado em 8,3% (6/72) das amostras avaliadas (KHAMRIN et al., 2008). Todas as sequências genômicas parciais analisadas formaram um ramo distinto na árvore filogenética em comparação a cepa protótipo U-I. Este estudo relatou a importância da identificação da presença de aichivírus B em outras regiões geográficas (KHAMRIN et al., 2008).

Em 2009, o kobuvírus bovino também foi identificado na Hungria em 6,25% (2/32) das amostras analisadas (REUTER; EGYED, 2009). RNA de outros agentes virais como rotavírus e norovírus também foram identificados nessas mesmas amostras de fezes provenientes de animais assintomáticos. Ainda em 2009, na Bélgica, foi avaliada a

presença do aichivírus B em 300 amostras de fezes de animais com diarreia tendo sido identificada a presença do kobuvirus bovino em três amostras que apresentavam coinfeção com norovírus bovino, sendo o principal agente encontrado nesse estudo com 24 amostras positivas (MAUROY et al., 2009).

Na Coreia do Sul, a frequência de diagnóstico de aichivírus B foi maior uma vez que esse vírus foi identificado em 34,6% (37/107) das amostras fecais avaliadas (JEOUNG et al., 2011). A maior porcentagem de positividade 37,2% (32/86) foi encontrada em animais com diarreia (JEOUNG et al., 2011). Entretanto, a presença de aichivírus B não pode ser considerada como agente causador da manifestação de diarreia. Neste estudo, a presença de coinfeção com outros vírus como coronavírus, rotavírus e vírus da diarreia viral bovina também foi relatada (JEOUNG et al., 2011).

Também na Coreia do Sul, foram analisadas amostras fecais de bezerros e de animais adultos com diarreia (PARK et al., 2011). O resultado revela que a infecção foi mais prevalente em animais jovens (primeiro mês de vida), encontrando 66,7% dos animais infectados. A detecção viral decresce com o aumento da idade, obtendo 25% (1/4) para a categoria jovem e 18,4% (9/49) de positivos nos animais adultos (PARK et al., 2011).

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

No Brasil, o aichivírus B foi inicialmente descrito em quatro regiões do país; Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, com maior frequência de detecção na região Sul, principalmente no estado do Paraná onde o vírus foi identificado em 50% dos rebanhos avaliados (RIBEIRO et al., 2014). Neste estudo, a maior prevalência ocorreu em bezerros com sinal clínico de diarreia (RIBEIRO et al., 2014). Assim como em outros estudos (JEOUNG et al., 2011; PARK et al., 2011), o aichivírus B também foi mais prevalente em animais jovens, com menos de 60 dias de idade. Nessa faixa etária 20,9% (38/182) das amostras analisadas foram positivas em comparação com apenas 5% (2/40) de positividade em fezes provenientes de animais com idade superior a um ano (RIBEIRO et al., 2014).

Esse estudo também comparou a presença do aichivírus B em rebanhos de corte e leite. O resultado encontrado foi a maior presença desse vírus em fezes de animais provenientes de rebanhos leiteiros 22,2% (26/117), enquanto para animais de corte foi de 13,3% (14/105). Por análise de sequenciamento os autores confirmaram a presença do aichivírus B nas amostras, destacando que as cepas encontradas formaram um ramo distinto

de cepas descritas na Coreia do Sul, Holanda, Itália, Hungria e Japão. Esse estudo foi o primeiro a revelar a presença e a distribuição desse agente viral entérico em rebanhos bovinos brasileiros (RIBEIRO et al., 2014).

Estudo subsequente, também conduzido no Brasil, apresentou taxa de detecção de 14,4 % (31/216) (CANDIDO et al., 2017) que é semelhante ao estudo prévio realizado em 2014 (RIBEIRO et al., 2014). Entretanto, a análise de pequenos fragmentos pertencentes à região que codifica a RNA polimerase viral (RdRP) permite somente a avaliação da presença do aichivírus B nos rebanhos sem a possibilidade de avaliação molecular de cepas virais circulantes, excluindo a possibilidade de classificação e comparação com cepas detectadas em outros países. Dessa forma, para o real conhecimento desse agente é necessária a avaliação de outros segmentos virais geneticamente variáveis, como a caracterização do gene que codifica a proteína VP1 (CHANG et al., 2014).

Um estudo apresentando análise filogenética com base na região que codifica a proteína VP1 do aichivírus B foi realizado em amostras identificadas na China. Este estudo avaliou 166 amostras fecais de bovinos e detectou 34,9% (58/166) de positivos (CHANG et al., 2014). O valor de identidade entre cepas classificadas na linhagem do *Kobuvirus bovinum* apresentam 95,6 até 100% de identidade de nt. Neste estudo os autores encontraram cepas classificadas como *Aichivirus B* com menor valor de identidade entre elas, revelando maior diversidade de cepas encontradas e sugere a classificação em quatro linhagens (1, 2, 3 e 4) ou genótipos (A, B, C e D). As análises das sequências encontradas apresentaram valor igual ou menor que 85,1% de identidade de nt como critério de classificação para uma nova linhagem ou genótipo.

Por esse motivo, os autores apresentaram a análise filogenética das cepas encontradas na China compondo a linhagem 2, 3 e 4 e a comparação com outras cepas previamente descritas em outros países, como a cepa japonesa classificada na linhagem 1 (genótipo A) demonstrando a diversidade filogenética das cepas de aichivírus B (CHANG et al., 2014).

Além da identificação em amostras de fezes, um estudo de caso realizado nos Estados Unidos da América (EUA) avaliou um bezerro que apresentava sinal clínico de diarreia com hipotonia dos quatro membros, cauda, cabeça e pescoço (MOREIRA et al., 2017). A pesquisa para outros agentes foi realizada encontrando a presença de *Cryptosporidium* spp. e rotavírus nas fezes. Entretanto, os autores relatam que o animal apresentou agravamento dos sinais clínicos neurológicos e por isso colheram o líquido que foi analisado por testes bioquímicos e por sequenciamento de nova geração.. O resultado da

análise foram alterações sugestivas de meningite e/ou encefalite sendo relacionado à presença de kobuvírus bovino (MOREIRA et al., 2017). Dessa forma, este estudo foi o primeiro relato da identificação extra-intestinal de aichivírus B, além de sugerir a presença do vírus com a apresentação de quadro clínico neurológico. Entretanto, os autores sinalizam para um possível risco de contaminação durante a coleta ou na manipulação do material no laboratório. Além disso, ressaltam a importância da utilização de outros testes de diagnóstico, bem como a pesquisa de outros agentes etiológicos, além daqueles que foram analisados (MOREIRA et al., 2017).

Embora a presença do aichivírus B seja amplamente relatada em todo o mundo, os efeitos associados com a presença desse agente em bovinos ainda não está compreendido. Dessa forma, observa-se que são necessários estudos adicionais para determinar o envolvimento do aichivírus B como agente etiológico de doenças em bovinos, além de identificar alguns aspectos relacionados à epidemiologia, vias de transmissão, eliminação e co-infecção com outros micro-organismos patogênicos.

2.3 *Kobuvirus canino (CaKV)*

O primeiro relato da infecção pelo kobuvírus em canídeos ocorreu em 2011 em dois estudos paralelos realizados no EUA que avaliaram amostras de fezes de cães com sinal clínico de diarreia (KAPOOR et al., 2011; LI et al., 2011). Pela análise filogenética os dois estudos relataram maior identidade entre as novas cepas encontradas com kobuvírus humano e de roedores analisando todas as regiões genômicas do vírus (P1, P2 e P3) agrupando no mesmo *cluster*, mas divergindo geneticamente do kobuvírus de bovinos e suínos previamente classificados no gênero *Kobuvirus*.

A identificação do CaKV nos EUA foi realizada por meio da análise de fezes e suabe retal de 18 animais com diarreia provenientes de três surtos distintos. As análises das sequências de nt revelaram 5% de alterações na região conservada (3D) e 4% ao longo da sequência de nt da proteína VP1 em comparação com o *Aichivirus A* (KAPOOR et al., 2011). Além disso, as novas cepas apresentaram semelhanças como pontos de clivagem presentes nas sequências de CaKV identificadas. Entretanto, a maior similaridade foi encontrada com cepas de *Aichivirus A* divergindo das cepas de *Kobuvirus* de outras espécies (KAPOOR et al., 2011).

Outro estudo que ocorreu simultaneamente no mesmo país avaliou 18 animais (jovens e adultos) pertencentes a canis e cães domiciliados com sinal clínico de

diarreia sanguinolenta entre os anos de 2009 e 2010. Neste estudo foram identificadas três amostras positivas para o CaKV com 93 a 98% de identidade de nt entre as cepas identificadas (LI et al., 2011).

Segundo Li et al. (2011) o critério utilizado para inclusão de uma cepa viral em um gênero da família *Picornaviridae* de acordo como o ICTV é que a mesma deve apresentar >40, >40 e >50% de similaridade de aminoácidos para as regiões P1, P2 e P3 do genoma, respectivamente. Para as três amostras positivas a análise revelou 75%, 83% e 86% de similaridade de aminoácidos com o *Aichivirus A* nas regiões P1, P2 e P3, respectivamente. Dessa forma, utilizando esse critério as cepas identificadas foram classificadas no gênero *Kobuvirus* (LI et al., 2011).

Além do CaKV outros agentes virais foram encontrados nas amostras estudadas, como parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), coronavírus canino (CCoV), sapovírus e rotavírus. Entretanto, o estudo aponta a descoberta do CaKV assim como sua interação com os outros vírus já previamente descritos e, considerando a estreita relação entre as espécies, relata a possibilidade de transmissão para o homem (LI et al., 2011).

A identificação de CaKV na Itália foi realizada em 2013 onde foram avaliadas 256 amostras de fezes de cães jovens de 3 a 4 meses de idade. Deste total foram identificadas seis amostras positivas para CaKV somente nos animais que apresentavam diarreia ($n=137$) revelando taxa de prevalência de 4,37% de positivos. A infecção mista com CPV e CCoV foi descrita em quatro amostras. Neste estudo, o CaKV não foi o principal agente encontrado, porém os autores ressaltam a presença desse agente em cães na Europa e a necessidade do conhecimento sobre a correlação do CaKV com outros agentes etiológicos de infecções entéricas (DI MARTINO et al., 2013).

A presença de coinfeção entre o CaKV com outros agentes entéricos também foi descrita na Coreia do Sul em um estudo que avaliou amostras fecais diarreicas de 91 animais com idade entre 1 e 24 meses. Este estudo identificou 2 (2,2%), 46 (50,5%), 49 (53,8%) e 61 (67,0%) amostras positivas para astrovírus (CAstV), CaKV, CPV e CCoV, respectivamente, também descrevendo a presença de CaKV com outros patógenos virais entéricos relacionados com o quadro clínico de diarreia (CHOI et al., 2014).

Em outro estudo conduzido no mesmo ano também na Coreia do Sul, o CaKV foi identificado em amostras de fezes de 59 animais com ($n=21$) e sem ($n=38$) sinal clínico de diarreia. O diagnóstico diferencial foi realizado com os principais vírus associados a infecções em cães como CPV, adenovírus canino (CAAdV), CCoV e *Canine Distemper Virus* (CDV) (OEM et al., 2014b). Neste estudo, foram identificados nove animais positivos para o

CaKV. A maior frequência de positivos ocorreu em animais jovens (67%; 6/9) com até 4 meses de idade, em comparação com os resultados obtidos em amostras fecais provenientes de animais adultos (33%; 3/9). A infecção mista de CaKV também foi encontrada em cinco animais (OEM et al., 2014b).

Animais positivos para o CaKV foi encontrado em um estudo realizado na China onde foi relatada a frequência de 4,7% (5/106) de animais positivos, sendo que todos os animais apresentavam o sinal clínico de enterite. As análises filogenéticas das amostras detectadas apresentaram valores de identidade de 93-94% com as cepas descritas nos EUA, migrando no mesmo ramo filogenético e não demonstrando alterações no perfil genético entre as cepas de diferentes países (KONG et al., 2016). A suscetibilidade dos animais jovens em apresentar infecção pelo CaKV, falha de proteção imune ou mesmo pela imaturidade do sistema de defesa animal são discutidos por Oem et al. (2014) e Kong et al. (2016), assim como havia sido discutido para a espécie suína (BARRY et al., 2011) como relevantes quando associados com a manifestação de sinais clínicos (diarreia, apatia, anorexia) em animais jovens e a diminuição das taxas de infecção nos animais adultos.

Além de caninos domésticos, o CaKV já foi relatado em fezes de caninos silvestres como *Golden jackal* e *Side striped jackal* na África. Com relação à análise filogenética envolvendo as cepas de todos os países onde o CaKV já foi descrito, as sequências formam um grupo homogêneo dentro do gênero do *Kobuvirus* (OLARTE-CASTILLO et al., 2015).

Por esse motivo, atualmente compõem a classificação do CaKoV quatro espécies de caninos; cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), chacal-dourado (*Canis aureus*) e chacal-listrado (*Canis adustus*) e a hiena-malhada (*Crocuta crocuta*) da família *Hyaenidae*, que até o momento é o único hospedeiro fora da espécie canina (DI MARTINO et al., 2014; OLARTE-CASTILLO et al., 2015).

O estudo demonstrando a classificação filogenética de uma cepa de kobuvírus identificada em felinos no agrupamento que congrega cepas de kobuvírus identificadas em caninos e humanos aumenta a relação da infecção por esse vírus não ser espécie específica. Com isso, aumenta consideravelmente a importância quanto ao risco à saúde pública com o potencial zoonótico da infecção, particularmente considerando a proximidade entre essas espécies (KONG et al., 2016).

Com isto, observa-se a necessidade da realização de estudos adicionais com o objetivo de esclarecer o real impacto da infecção causada pelos CaKV nos animais. As pesquisas envolvendo várias espécies animais ocorrendo simultaneamente em todo o mundo podem auxiliar na compreensão de aspectos relativos à uma possível patogenia da infecção por esse vírus e sobre o comportamento dos kobuvírus no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABUELO, A. Investigation of an outbreak of neonatal calf diarrhoea in a dairy herd. **Veterinary Record Case Reports**, v. 4, n. 2, 2016.
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-6, 2006.
- AMBERT-BALAY, K.; LORROT, M.; BON, F.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; WOLFER, M.; LEBON, P.; GENDREL, D.; POTHIER, P. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1252-8, 2008.
- ANTHONY, S.J.; EPSTEIN, J.H.; MURRAY, K.A.; NAVARRETE-MACIAS, I.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.M.; SOLOVYOV, A.; OJEDA-FLORES, R.; ARRIGO, N.C.; ISLAM, A.; ALI KHAN, S.; HOSSEINI, P.; BOGICH, T.L.; OLIVAL, K.J.; SANCHEZ-LEON, M.D.; KARESH, W.B.; GOLDSTEIN, T.; LUBY, S.P.; MORSE, S.S.; MAZET, J.A.; DASZAK, P.; LIPKIN, W.I. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. **mBio**, v. 4, n. 5, p. e00598-13, 2013.
- BARRY, A.F.; RIBEIRO, J.; ALFIERI, A.F.; VAN DER POEL, W.H.; ALFIERI, A.A. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1811-4, 2011.
- BARTELS, C.J.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W.A.; LAM, T.J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162-9, 2010.

BODEWES, R.; GONZALEZ, A.R.; SCHAPENDONK, C.M.E.; van den BRAND, J.M.A.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; SMITS, S.L. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. **Virology Journal**, v.11, n. 1, p.89, 2014.

CANDIDO, M.; BATINGA, M.C.; ALENCAR, A.L.; DE ALMEIDA-QUEIROZ, S.R.; DA GLORIA BUZINARO, M.; LIVONESI, M.C.; FERNANDES, A.M.; DE SOUSA, R.L. Molecular characterization and genetic diversity of bovine Kobuvirus, Brazil. **Virus Genes**, v. 53, n. 1, p. 105-110, 2017.

CARMONA-VICENTE, N.; BUESA, J.; BROWN, P.A.; MERGA, J.Y.; DARBY, A.C.; STAVISKY, J.; SADLER, L.; GASKELL, R.M.; DAWSON, S.; RADFORD, A.D. Phylogeny and prevalence of kobuviruses in dogs and cats in the UK. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 246-52, 2013.

CHANG, J.; WANG, Q.; WANG, F.; JIANG, Z.; LIU, Y.; YU, L. Prevalence and genetic diversity of bovine kobuvirus in China. **Archives of Virology**, v. 159, n. 6, p. 1505-10, 2014.

CHOI, J.W.; LEE, M.H.; LEE, K.K.; OEM, J.K. Genetic characteristics of the complete feline kobuvirus genome. **Virus Genes**, v. 50, n. 1, p. 52-7, 2015.

CHOI, S.; LIM, S.I.; KIM, Y.K.; CHO, Y.Y.; SONG, J.Y.; AN, D.J. Phylogenetic analysis of astrovirus and kobuvirus in Korean dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 8, p. 1141-5, 2014.

CHOW, J.; LEE, S.M.; SHEN, Y.; KHOSRAVI, A.; MAZMANIAN, S.K. Host-bacterial symbiosis in health and disease. **Advances in Immunology**, v. 107, p. 243-74, 2010.

CHUNG, J.Y.; KIM, S.H.; KIM, Y.H.; LEE, M.H.; LEE, K.K.; OEM, J.K. Detection and genetic characterization of feline kobuviruses. **Virus Genes**, v. 47, 2013.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; DI FELICE, E.; CECI, C.; PISTILLI, M.G.; MARSILIO, F. Molecular detection of bovine kobuviruses in Italy. **Archives of Virology**, v. 157, n. 12, p. 2393-6, 2012.

DI MARTINO, B.; DI FELICE, E.; CECI, C.; DI PROFIO, F.; MARSILIO, F. Canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 246-9, 2013.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; MELEGARI, I.; ROBETTO, S.; DI FELICE, E.; ORUSA, R.; MARSILIO, F. Molecular evidence of kobuviruses in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*). **Archives of Virology**, v. 159, n. 7, p. 1803-6, 2014.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; MELEGARI, I.; DI FELICE, E.; ROBETTO, S.; GUIDETTI, C.; ORUSA, R.; MARTELLA, V.; MARSILIO, F. Molecular detection of kobuviruses in European roe deer (*Capreolus capreolus*) in Italy. **Archives of Virology**, v. 160, n. 8, p. 2083-6, 2015.

DREXLER, J.F.; BAUMGARTE, S.; DE SOUZA LUNA, L.K.; ESCHBACH-BLUDAU, M.; LUKASHEV, A.N.; DROSTEN, C. Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. **Emerging Infectious Diseases** v. 17, n. 8, p. 1544-8, 2011.

DUFKOVA, L.; SCIGALKOVA, I.; MOUTELIKOVA, R.; MALENOVSKA, H.; PRODELALOVA, J. Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an emerging new sapovirus GIII genotype. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, p. 549-58, 2013.

GOODWIN, S.; TUTHILL, T.J.; ARIAS, A.; KILLINGTON, R.A.; ROWLANDS, D.J. Foot-and-mouth disease virus assembly: processing of recombinant capsid precursor by exogenous protease induces self-assembly of pentamers in vitro in a myristoylation-dependent manner. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11275-82, 2009.

GOYER, M.; AHO, L.S.; BOUR, J.B.; AMBERT-BALAY, K.; POTHIER, P. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. **Archives of Virology**, v. 153, n. 6, p. 1171-4, 2008.

HANDLEY, S.A. The virome: a missing component of biological interaction networks in health and disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 32, 2016.

HEADLEY, S.A.; BODNAR, L.; SILVA, A.P.; ALFIERI, A.F.; GOMES, L.A.; OKANO, W.; ALFIERI, A.A. Canine distemper virus with concomitant infections due to canine herpesvirus-1, canine parvovirus, and canine adenovirus in puppies from Southern Brazil. **Jacobs Journal of Microbiology and Pathology**, v. 1, n. 2, p. 015, 2015.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, v. Accessed 22 March 2017, 2016.

JEOUNG, H.Y.; LIM, J.A.; JEONG, W.; OEM, J.K.; AN, D.J. Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008-2010. **Virus Genes**, v. 42, n. 3, p. 402-6, 2011.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-3, 2008.

JONSSON, N.; WAHLSTROM, K.; SVENSSON, L.; SERRANDER, L.; LINDBERG, A.M. Aichi virus infection in elderly people in Sweden. **Archives of Virology**, v. 157, n. 7, p. 1365-9, 2012.

KAPOOR, A.; SIMMONDS, P.; DUBOVI, E.J.; QAISAR, N.; HENRIQUEZ, J.A.; MEDINA, J.; SHIELDS, S.; LIPKIN, W.I. Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. **Journal Virology**, v. 85, n. 21, p. 11520-25, 2011.

KEMPF, B.J.; BARTON, D.J. Picornavirus RNA polyadenylation by 3D(pol), the viral RNA-dependent RNA polymerase. **Virus Research**, v. 206, p. 3-11, 2015.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H. Bovine kobuviruses from cattle with diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 985-6, 2008.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; HIDAKA, S.; KISHIKAWA, S.; USHIJIMA, K.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 950-4, 2010.

KONG, N.; ZUO, Y.; WANG, Z.; YU, H.; ZHOU, E.M.; SHAN, T.; TONG, G. Molecular characterization of new described kobuvirus in dogs with diarrhea in China. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 2047, 2016.

LI, L.; PESAVENTO, P.A.; SHAN, T.; LEUTENEGGER, C.M.; WANG, C.; DELWART, E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. **Journal General Virology**, v. 92, n.t 11, p. 2534-41, 2011.

MAUROY, A.; SCIPIONI, A.; MATHIJS, E.; THYS, C.; THIRY, E. Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. **Archives of Virology**, v. 154, n. 11, p. 1841-5, 2009.

MOREIRA, A.S.; RAABIS, S.M.; GRAHAM, M.E.; DREYFUS, J.M.; SIBLEY, S.D.; GODHARDT-COOPER, J.A.; TOOHEY-KURTH, K.L.; GOLDBERG, T.L.; PEEK, S.F. Identification by next-generation sequencing of Aichivirus B in a calf with enterocolitis and neurologic signs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 29, n. 2, p. 208-211, 2017.

OEM, J.K.; LEE, M.H.; LEE, K.K.; AN, D.J. Novel Kobuvirus species identified from black goat with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 563-7, 2014a.

OEM, J.K.; CHOI, J.W.; LEE, M.H.; LEE, K.K.; CHOI, K.S. Canine kobuvirus infections in Korean dogs. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2751-5, 2014b.

OH, D.Y.; SILVA, P.A.; HAUROEDER, B.; DIEDRICH, S.; CARDOSO, D.D.; SCHREIER, E. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. **Archives of Virology**, v. 151, n. 6, p. 1199-206, 2006.

OIE, O.M.D.S.A.-. Foot and mouth disease. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/FMD-EN.pdf, Accessed in: 03 November 2016, 2016. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/> >.

OLARTE-CASTILLO, X.A.; HEEGER, F.; MAZZONI, C.J.; GREENWOOD, A.D.; FYUMAGWA, R.; MOEHLMAN, P.D.; HOFER, H.; EAST, M.L. Molecular

characterization of canine kobuvirus in wild carnivores and the domestic dog in Africa. **Virology**, v. 477, p. 89-97, 2015.

OTOMARU, K.; NAOI, Y.; HAGA, K.; OMATSU, T.; UTO, T.; KOIZUMI, M.; MASUDA, T.; YAMASATO, H.; TAKAI, H.; AOKI, H.; TSUCHIYAMA, S.; SANO, K.; OKAZAKI, S.; KATAYAMA, Y.; OBA, M.; FURUYA, T.; SHIRAI, J.; KATAYAMA, K.; MIZUTANI, T.; NAGAI, M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 2, p. 321-4, 2016.

PANKOVICS, P.; BOROS, A.; BIRO, H.; HORVATH, K.B.; PHAN, T.G.; DELWART, E.; REUTER, G. Novel picornavirus in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus var. domestica*). **Infectious Genetics and Evolution**, v. 37, p. 117-22, 2016.

PARK, S.J.; KIM, H.K.; MOON, H.J.; SONG, D.S.; RHO, S.M.; HAN, J.Y.; NGUYEN, V.G.; PARK, B.K. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1803-11, 2010.

PARK, S.J.; KIM, H.K.; SONG, D.S.; MOON, H.J.; PARK, B.K. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 1178-82, 2011.

PHAN, T.G.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.; ROSE, R.K.; LIPTON, H.L.; DELWART, E.L. The fecal viral flora of wild rodents. **PLoS Pathogens** v. 7, n. 9, p. e1002218, 2011.

PORTES, S.A.; DE MELLO VOLOTÃO, E.; ROSE, T.L.; ROCHA, M.S.; TRINDADE PINHEIRO XAVIER MDA, P.; DE ASSIS, R.M.; FIALHO, A.M.; ROCHA, M.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; GAGLIARDI LEITE, J.P.; CARVALHO-COSTA, F.A. Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease. **Current HIV Research**, v. 13, n. 4, p. 325-31, 2015.

PORTES, S.A.; VOLOTÃO EDE, M.; ROCHA, M.S.; REBELO, M.C.; XAVIER MDA, P.; ASSIS, R.M.; ROSE, T.L.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LEITE, J.P.; CARVALHO-COSTA, F.A. A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 6, p. 403-6, 2016.

RIEDER, E.; BRUM, M.C. S. *Picornaviridae*. In: **Virologia Veterinária**. FLORES, E.F (Ed). 1th ed. Santa Maria. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 539-561.

REUTER, G.; BOLDIZSAR, A.; PANKOVICS, P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. **Archives of Virology**, v. 154, 2009.

REUTER, G.; EGYED, L. Bovine kobuvirus in europe. **Emerging Infectious Disease**, v. 15, n. 5, p. 822-3, 2009.

REUTER, G.; BOLDIZSAR, A.; PAPP, G.; PANKOVICS, P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1529-32, 2009.

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

REUTER, G.; KECSKEMETI, S.; PANKOVICS, P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 4, p. 696-8, 2010.

REUTER, G.; BOROS, A.; PANKOVICS, P. Kobuviruses - a comprehensive review. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 1, p. 32-41, 2011.

RIBEIRO, J.; DE ARRUDA LEME, R.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. High frequency of Aichivirus C (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 8, p. 1757-62, 2013.

RIBEIRO, J.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Kobuvirus (Aichivirus B) infection in Brazilian cattle herds. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 2, p. 177-82, 2014.

RIBES, J.M.; MONTAVA, R.; TELLEZ-CASTILLO, C.J.; FERNANDEZ-JIMENEZ, M.; BUESA, J. Seroprevalence of Aichi virus in a Spanish population from 2007 to 2008. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 545-9, 2010.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-23, 2009.

VERMA, H.; CHITAMBAR, S.D.; GOPALKRISHNA, V. Circulation of Aichi virus genotype B strains in children with acute gastroenteritis in India. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 11, p. 1687-91, 2011.

YAMASHITA, T.; KOBAYASHI, S.; SAKAE, K.; NAKATA, S.; CHIBA, S.; ISHIHARA, Y.; ISOMURA, S. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 5, p. 954-7, 1991.

YAMASHITA, T.; SAKAE, K.; ISHIHARA, Y.; ISOMURA, S.; UTAGAWA, E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2938-43, 1993.

YAMASHITA, T.; SAKAE, K.; TSUZUKI, H.; SUZUKI, Y.; ISHIKAWA, N.; TAKEDA, N.; MIYAMURA, T.; YAMAZAKI, S. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. **Journal of Virology**, v. 72, n. 10, p. 8408-12, 1998.

YAMASHITA, T.; SUGIYAMA, M.; TSUZUKI, H.; SAKAE, K.; SUZUKI, Y.; MIYAZAKI, Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2955-61, 2000.

YAMASHITA, T.; ITO, M.; KABASHIMA, Y.; TSUZUKI, H.; FUJIURA, A.; SAKAE, K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. **Journal General Virology**, v. 84, n. Pt 11, p. 3069-77, 2003.

YANG, S.; ZHANG, W.; SHEN, Q.; YANG, Z.; ZHU, J.; CUI, L.; HUA, X. Aichi virus strains in children with gastroenteritis, China. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 10, p. 1703-5, 2009.

YANG, F.; LIU, X.; ZHOU, Y.; LYU, W.; XU, S.; XU, Z.; ZHU, L. Histopathology of porcine kobuvirus in Chinese piglets. **Virologica Sinica**, v. 30, n. 5, p. 396-9, 2015.

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar infecções sintomáticas por kobuvírus em animais e avaliar algumas características moleculares do genoma (RNA) viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar pela técnica de RT-PCR a presença de RNA de *Aichivirus B* em amostras de fezes de bezerros leiteiros com até 30 dias de idade provenientes de um surto de diarreia com etiologia desconhecida;
- Determinar características epidemiológicas da infecção como frequência de diagnóstico em fezes diarreicas e não diarreicas, bem como faixa etária mais susceptível à infecção por meio da estratificação da amostragem em semanas de idade dos bezerros;
- Avaliar a possibilidade de prováveis infecções mistas por enteropatógenos clássicos envolvidos em episódios de diarreia neonatal em bezerros;
- Determinar a presença do kobuvírus canino em amostra de fezes e fragmentos de órgãos de um cão com quadro clínico entérico;
- Avaliar a presença de coinfeção com outros agentes comumente descritos em cães pela análise de fragmentos de órgãos por meio das técnicas de PCR, RT-PCR e imunohistoquímica;
- Examinar a presença de alterações patológicas nos fragmentos de órgãos do cão necropsiado;
- Realizar análises filogenéticas em cepas brasileiras de *Aichivirus B* e de kobuvírus canino por meio do sequenciamento de produtos amplificados por RT-PCR das regiões RdRP e VP1;

- Realizar estudos moleculares comparativos entre os resultados obtidos nas cepas brasileiras descritas nesse estudo com cepas de kobuvírus provenientes de outros países e disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*).

4.1 ARTIGO A

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF VP1 AND RdRP GENES OF AICHIVIRUS B BRAZILIAN STRAINS INVOLVED IN A DIARRHEA OUTBREAK IN DAIRY CALVES

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico: *Virus Genes*

Phylogenetic analysis of VP1 and RdRP genes of Aichivirus B Brazilian strains involved in a diarrhea outbreak in dairy calves

Abstract

The genus *Kobuvirus* in the *Picornaviridae* family, is divided in six species *Aichivirus A* to *F*. *Aichivirus B* has been reported, most commonly in calves, but also in adult cattle with and without clinical signs of diarrhea. The aim of this study was to describe the molecular characteristics of the RdRP and, particularly, the VP1 genes of *Aichivirus B* wild-type strains that has been identified as the most frequent etiologic agent in a neonatal diarrhea outbreak in calves with good nutritional and health management in a high-production Brazilian dairy herd. Diarrheic calves were irresponsive to treatment with broad-spectrum antibiotic therapy. Preliminary laboratory analyses ruled out important enteropathogens (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Escherichia coli* F5, and bovine coronavirus). Twenty-four diarrheic fecal samples from calves up to 30 days of age were collected for virological analysis. Additionally, as a control group, five fecal samples from asymptomatic calves were collected. RT-PCR assays were performed for the detection of *Aichivirus B* RdRP and VP1 genes and for rotavirus A VP7 and VP4 genes in fecal samples. *Aichivirus B* was detected in 54.2% (13/24) of the diarrheic fecal samples, and rotavirus A G10P[11] genotypes were found in 25% (6/24) of the samples. Asymptomatic calves were negative for both viruses. *Aichivirus B* was only identified in calves up to two weeks old. In this age group, the rate of positive calves was 83.3% (10/12). The phylogenetic analysis based on the RdRP gene grouped the *Aichivirus B* Brazilian strains in a new branch within the *Aichivirus B* cluster. Comparative analysis of the nucleotide sequence of the VP1 gene of Brazilian and Chinese *Aichivirus B* strains allowed the strains *Aichivirus B* identified in this study to be classified in the putative lineage 1 (genotype A). This is the first description of a high rate of *Aichivirus B* identification in fecal samples from a diarrhea outbreak in dairy calves, and it is the first phylogenetic study based in the VP1 gene of *Aichivirus B* wild-type strains performed in South America.

Keywords: Dairy cattle herd, calf; enteric infection; *Kobuvirus*; VP1 gene.

1. Introduction

In dairy cattle herds, neonatal diarrhea is considered one of the main infectious diseases in suckling calves worldwide (1-3). Some classes of microorganisms, such as bacteria, protozoa, and viruses, are infectious agents and are considered determinants of neonatal diarrhea (4). Singular and mixed infections involving different classes and types of microorganisms are commonly reported (5, 6).

Aichivirus B belongs to the *Picornaviridae* family, genus *Kobuvirus* (7). The virions are non-enveloped, with icosahedral symmetry and a diameter of 27-30 nm, and they are single-stranded positive-sense RNA (8). Currently, the genus *Kobuvirus* is divided in six species (*Aichivirus A-F*) as host the humans and various species of animals (7).

The viral genome contains a leader (L) protein and has structural (VP0, VP3, and VP1) and non-structural (2A-2C and 3A-3D) regions (9). The 3D segment of the kobuvirus genome is a conserved genomic region, which encodes the enzyme RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). By contrast, the VP1 protein is the most exposed region of the picornavirus capsid and has a high probability of structural variation. This characteristic makes the VP1 gene the most likely target for molecular analysis among the *Kobuvirus* (10, 11).

Aichivirus B was first identified in serum and fecal samples from asymptomatic cattle from Japan in 2003 (U-I strain) (11). However, since this study, Aichivirus B infection has been reported in cattle herds worldwide and occurs more frequently in young animals with clinical signs of diarrhea (12-14).

In Brazil, Aichivirus B was identified in young and adult cattle in all Brazilian geographical regions in both dairy and beef herds (15, 16). However, most reports of the occurrence of Aichivirus B worldwide were performed in retrospective and transversal epidemiological surveys (13, 15, 16).

A study performed in China analyzing the VP1 gene nucleotide (nt) sequence of Aichivirus B wild strains showed molecular diversity, with four putative genotypes (A, B, C and D) or lineages (I, II, III and IV) with a cut off of 85.1% nt identity based on VP1 protein of the Aichivirus B (17). However, other studies based on the genetic characterization of Aichivirus B strains using VP1 gene analysis are not available.

The aim of this study was to describe the molecular characteristics of the RdRP and, particularly, the VP1 genes of Aichivirus B wild-type strains, which have been identified as the most frequent etiologic agent in a neonatal diarrhea outbreak in calves from a high-production Brazilian dairy herd.

2. Materials and methods

Study location and clinical history

In early March 2015, calves with clinical signs of diarrhea from a dairy cattle herd located in the central region of the state of Paraná, southern Brazil, were evaluated. This geographical region of Paraná state is the main milk producing region of Brazil and is notable because of the high production, technology, health, and quality levels throughout the production chain. The farm had cows of the Holstein breed managed in a free-stall system for milk production. At the time of sample collection, the farm had 930 lactating cows with two daily milkings, with an average production of 40 liters/animal/day. The nutritional and health management of the animals, including adults (cows) and young animals (heifers and calves), were adequate for the level of dairy production on the farm.

Only female calves were raised on the dairy farm, and to ensure good passive immunity, colostrum management was routinely used. For the control and prevention of neonatal diarrhea, the cows were routinely vaccinated at the end of the pregnancy with inactivated commercial vaccine containing bovine rotavirus A genotype G6P[5] (UK strain), bovine coronavirus (Mebus strain), and *Escherichia coli* (*E. coli*) F5 (K99), according to the manufacturer's instructions. However, in the summer of 2015, an outbreak of watery diarrhea unresponsive to broad-spectrum antibiotic therapy that primarily compromised calves in the first month of life was reported. Over a period of approximately 25 days, the morbidity rates reached approximately 35%.

To perform a preliminary diagnosis, five fecal samples of diarrheic calves up to 30 days of age were evaluated for *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. oocyst detection by using modified Ziehl-Nelsen (18) and Gordon and Whitlock techniques (19), respectively. Additionally, five diarrheic fecal samples from calves up to 7-day-old were analyzed by PCR assay (20) to determine the presence of enterotoxigenic *E. coli* F5 (K99). All diarrheic fecal samples that were initially evaluated were negative for the enteric pathogens (protozoa and bacteria) tested.

Because the animals with diarrhea were not responsive to broad-spectrum antibiotic therapy, were negative for parasitological examinations of the two main protozoa, and were negative in PCR assays for enterotoxigenic *E. coli* F5 (K99), the etiology of this neonatal diarrhea outbreak was determined by investigating RNA viruses that have been recognized as enteropathogenic for calves.

Fecal samples

For the virological evaluation, 24 diarrheic fecal samples from calves up to 30 days of age; were collected in gloves directly from the rectum. All calves included in the study were randomly selected and had yellowish diarrhea with clinic signs of anorexia and apathy. Additionally, as a control group, five fecal samples from asymptomatic calves were collected.

Nucleic acid extraction

Fecal suspensions were prepared at 10-20% (w/v) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 14 mM KH₂PO₄), and centrifuged at 3,000 x g for 5 min. Nucleic acid extraction was performed with 400 µL of fecal suspensions using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate methods (21). The nucleic acid was eluted in 50 µL of ultra-pure RNase-free diethylpyrocarbonate-treated sterile water. Ultrapure sterile water was included as a negative control in all viral nucleic acid extraction procedures and known positive fecal samples for each viral agent analyzed were included as a positive control (1, 16, 22).

Virological analysis

RNA of the two most frequent enteric viruses in the calf diarrheic fecal sample was investigated using molecular techniques (SN-PCR and RT-PCR) to amplify a 251-bp length of the bovine coronavirus (BCoV) N gene (23) and 876 bp and 1,062 bp of the bovine rotavirus A (RVA) VP4 (VP8*) and VP7 genes, respectively (24, 25). Evaluation of the presence Aichivirus B RNA was performed by RT-PCR to amplify 631- and 1,159-bp lengths of the RdRP and VP1 partial genes, respectively (8, 17). Nuclease-free water was used as a negative control in all PCR assays. The amplified products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel in Tris-Borate-EDTA buffer, pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL), and visualized under UV light.

Sequence analysis

RT-PCR amplified products with better quality were selected to characterize the specificity and for phylogenetic analysis. The amplicons were purified using the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantified in a Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

using the forward and reverse primers used in the RT-PCR assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence quality analysis was performed using the PHRED software and the consensus sequences were assembled using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarity searches were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) to verify the nt similarity with sequences deposited in public databases. The phylogenetic tree and the nt sequence identity matrix were constructed using the MEGA version 6.0 and BioEdit version 7.2.5 software, respectively. The analyses were based on the neighbor-joining method from the Kimura 2-parameter model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The G and P genotypes of RVA were determined using the RotaC^{2.0} genotyping tool (26). The referenced sequences included in this study were acquired from GenBank.

3. Results

All fecal samples with normal consistency ($n=5$) included in this study were negative for the three evaluated viral agents. BCoV RNA was also not identified in any of the 24 diarrheic fecal samples evaluated, which allowed us to discard this important enteric virus in the etiology of the diarrhea outbreak studied.

RVA RNA was amplified in 25% (6/24) of the fecal samples from diarrheic calves; three calves presented singular infection, and the other three showed mixed infection with Aichivirus B. Nucleotide sequence analysis of the G and P gene-amplified products of RVA strains identified in the diarrhea outbreak showed that the infecting RVA strains belong to the genotype G10P[11].

Of the 24 diarrheic fecal samples analyzed, 13 (54.2%) were positive for Aichivirus B, but this was only identified in calves that were one and two weeks old. In this age group (8 to 14 days old), the rate of Aichivirus B positive calves reached 83.3% (10/12). Table 1 shows the distribution of results according to the age group of calves.

For Aichivirus B, amplicon sequencing confirmed the specificity of the amplified products. RdRP gene phylogenetic analysis of three Aichivirus B strains (GenBank accession numbers: KX587946, KX587947, and KX587948) revealed 90.7 to 90.9%, 91.6 to 92.1%, and 91.8% nt identity with the Aichivirus B strains described in Korea, China, and Japan, respectively (Figure 1A).

Table 1. Distribution of Aichivirus B positive fecal samples according to the age of calves identified in a neonatal diarrhea outbreak in a dairy cattle herd in Brazil.

Age / week	Aichivirus B		Negative	Total
	Single	Mixed*		
First	3	—	1	4
Second	7	3	2	12
Third	—	—	5 ^a	5
Fourth	—	—	3 ^b	3
Total	10	3	11	24

* fecal samples positive for Aichivirus B and RVA simultaneously.

Two^a and one^b fecal samples were positive only for RVA at the third and fourth weeks of age, respectively.

The sequence analysis of two VP1 gene RT-PCR products allowed a comparative analysis of the sequences identified in this study with the Aichivirus B of Chinese strains that were classified in the putative lineages (genotypes) proposed by Chang et al. (2014). The two Brazilian Aichivirus B strains (GenBank accession numbers: KX592587 and KX592588) grouped in the same branch of the prototype strain (U-1) classified as lineage 1 (genotype A) showed 90.1%, 84.4 to 85.1%, 84.2 to 84.4%, and 84.7% nt identity with representative Aichivirus B strains from the putative lineages 1, 2, 3, and 4, respectively (Figure 1B).

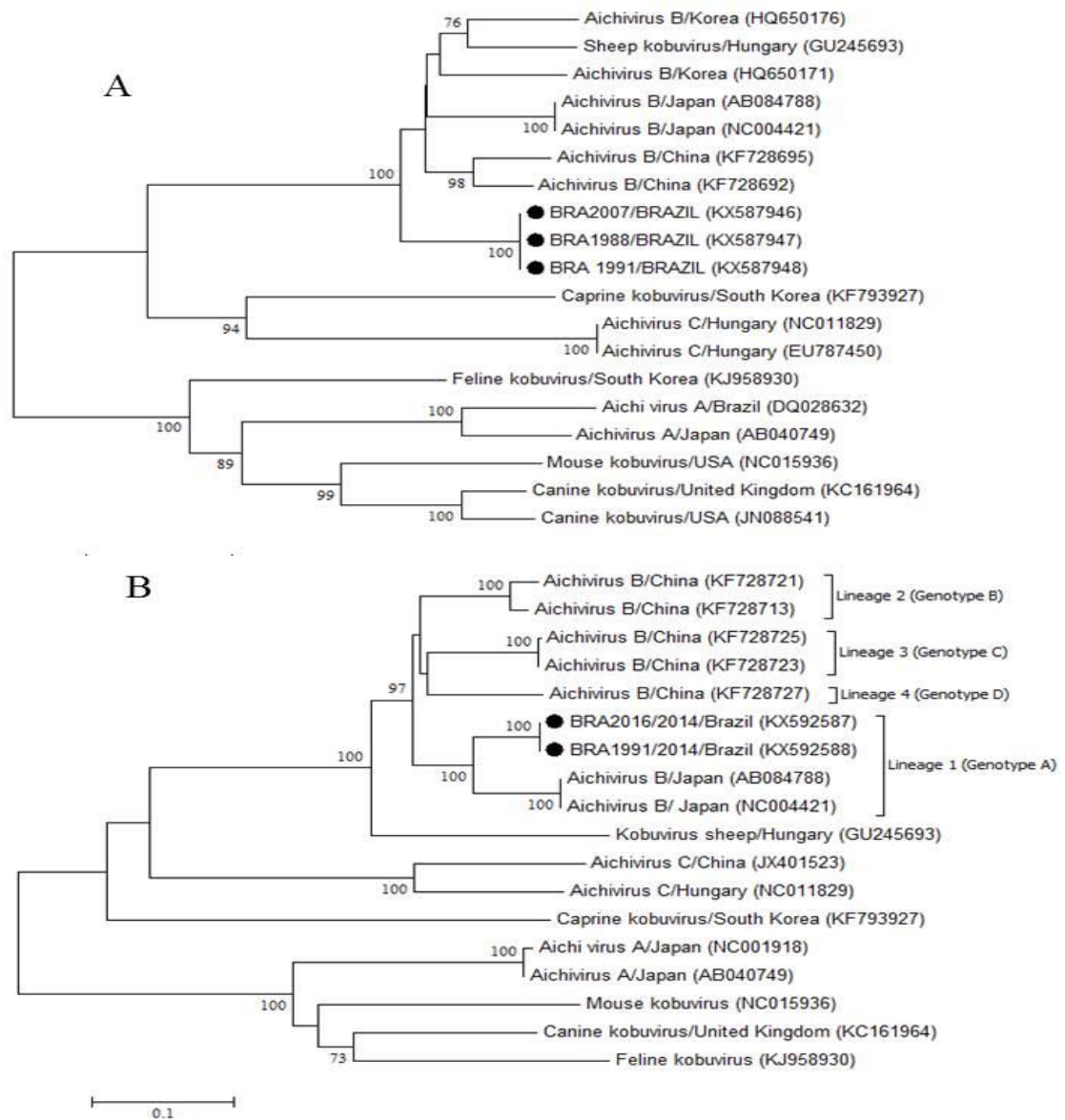


Figure 1 Phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence (551 bp) of the RdRP gene (A) and a partial region of the VP1 gene (535 bp) (B) of Brazilian Aichivirus B strains. The tree was generated using the neighbor-joining method and Kimura 2-parameter as the nucleotide substitution model. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70% are shown. The Aichivirus B strains identified in this study are marked with a filled circle.

4. Discussion

The diarrhea outbreak described in this study included diarrheic dairy calves that were irresponsive to treatment with broad-spectrum antibiotic therapy. The preliminary laboratory

analyses ruled out some important enteropathogens (*Cryptosporidium* spp.; *Eimeria* spp., and *E. coli* F5). With this information, we evaluated the probability that three known enteric RNA viruses (RVA, BCoV, and Aichivirus B) were involved in the etiology of this severe diarrhea outbreak.

Although BCoV is considered an important etiological agent of neonatal diarrhea worldwide (1, 27, 28), it had no influence on this outbreak in dairy calves because all diarrheic fecal samples included in the analysis were negative for this virus.

Throughout the world, RVA is reported as the main viral cause of neonatal diarrhea in calves of dairy and beef cattle herds (22, 29). In this outbreak, 25% (6/24) of diarrheic calves evaluated were RVA-positive in both single ($n = 3$; 12.5%) or mixed ($n = 3$; 12.5%) infections with Aichivirus B. Reports of mixed infection involving Aichivirus B and other enteric viruses are frequent, mainly with the presence of RVA and BCoV (13, 16). This study, mixed infection with RVA in addition to a high frequency of Aichivirus B may contribute to clinical signs of diarrhea. In general, enteric infections caused by more than one microorganism are more severe than a single infection (1), as observed in this study.

Notably, all late pregnancy cows from this dairy farm received an inactivated commercial vaccine containing enteropathogens such as the RVA UK strain genotype G6P[5] and good colostrum management was adopted on the farm to provide adequate levels of passive immunity. However, the RVA strain that was involved in this diarrhea outbreak was classified as genotype G10P[11]. Failures in heterologous passive protection have been described as a cause of diarrhea by wild-type RVA strains with distinct genotypes from RVA vaccine strains in calves of both dairy and beef cattle herds (22, 29).

Aichivirus B was the main viral agent found in 54.2% (13/24) of the diarrheic fecal samples evaluated. In other studies, this enteric virus is described with high positivity rates, which reach 34.9% (58/166) in China (17) and 77.8% (7/9) in the Netherlands (12). Furthermore, retrospective transversal studies conducted in Brazil revealed the presence of this enteric viral agent in 18.2% (40/222) (16) and 14.4% (31/216) (15) of the fecal samples analyzed with a higher number of positive animals in dairy cattle farms.

For age group, only calves up to two weeks of age were Aichivirus B-positive (81.25%; 13/16). Higher frequencies of diagnosis for Aichivirus B in feces of calves up to one month of age have also been reported in the Netherlands revealed 77.8% (12) and Korea with 34.6% (13).

Phylogenetic analysis of Brazilian Aichivirus B strains based on the 3D conserved genomic region encoding the viral polymerase (RdRP) reveals a difference in the position of

the branches on the phylogenetic tree compared to the Japanese, Chinese, and Korean strains (Figure 1A).

However, the main region for *Picornavirus* phylogenetic analysis is the VP1 capsid protein gene (10). Therefore, the Brazilian Aichivirus B VP1 gene sequences were classified in putative lineage 1 (genotype A), revealing greater (90.1%) nt identity with the Aichivirus B prototype strain (U-I), according to the classification proposed in 2014 by Chang and colleagues. This result confirms the molecular diversity of Aichivirus B strains circulating worldwide and demonstrates that the strains identified in South America present molecular divergence from China strains.

In conclusion, most surveys on the frequency of Aichivirus B infection in cattle herds are transversal studies that include the analysis of several fecal samples from calves with or without diarrhea from different dairy and/or beef herds. To the authors' knowledge, this is the first description of a high rate of Aichivirus B identification in fecal samples from a diarrhea outbreak in dairy calves, and it is the first phylogenetic study based on the VP1 gene of Aichivirus B wild-type strains performed in South America.

Conflict of interest- The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian institutes: National Council of Scientific and Technological Development (CNPq – grant number 305062/2015-8), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. and Lorenzetti, E. are recipients of CNPq fellowships.

References

1. A.F. Barry, A.F. Alfieri, D.T. Stipp, A.A. Alfieri, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **52**, 45-49, 2009.
2. A. Abuelo, *Vet. Rec. Case Rep.* **4**, 2016.
3. C.J. Bartels, M. Holzhauser, R. Jorritsma, W.A. Swart, T.J. Lam, *Prev. Vet. Med.* **93**, 162-169, 2010.

4. F.M. Coura, M.D. Freitas, J. Ribeiro, R.A. de Leme, C. de Souza, A.A. Alfieri, E.J. Facury Filho, A.U. de Carvalho, M.X. Silva, A.P. Lage, M.B. Heinemann, *Trop. Anim. Health Prod.* **47**, 3-11, 2015.
5. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA
Brasil, 2017.
6. J. Al Mawly, A. Grinberg, D. Prattley, J. Moffat, J. Marshall, N. French, *Vet. J.* **203**, 155-160, 2015.
7. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, 2017.
8. T. Yamashita, M. Ito, Y. Kabashima, H. Tsuzuki, A. Fujiura, K. Sakae, *J. Gen. Virol.* **84**, 3069-3077, 2003.
9. T. Yamashita, K. Sakae, H. Tsuzuki, Y. Suzuki, N. Ishikawa, N. Takeda, T. Miyamura, S. Yamazaki, *J. Virol.* **72**, 8408-8412, 1998.
10. G. Reuter, A. Boros, P. Pankovics, *Reviews in Medical Virology* **21**, 32-41, 2011.
11. T. Yamashita, M. Ito, Y. Kabashima, H. Tsuzuki, A. Fujiura, K. Sakae, *J. Gen. Virol.* **84**, 3069-3077, 2003.
12. A.F. Barry, J. Ribeiro, A.F. Alfieri, W.H. van der Poel, A.A. Alfieri, *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1811-1814, 2011.
13. H.Y. Jeoung, J.A. Lim, W. Jeong, J.K. Oem, D.J. An, *Virus Genes* **42**, 402-406, 2011.
14. G. Reuter, L. Egyed, *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 822-823, 2009.
15. M. Candido, M.C. Batinga, A.L. Alencar, S.R. de Almeida-Queiroz, M. da Gloria Buzinaro, M.C. Livonesi, A.M. Fernandes, R.L. de Sousa, *Virus Genes* **53**, 105-110, 2017.
16. J. Ribeiro, E. Lorenzetti, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, *Vet. Res. Commu.* **38**, 177-182, 2014.

17. J. Chang, Q. Wang, F. Wang, Z. Jiang, Y. Liu, L. Yu, *Arch. Virol.* **159**, 1505-1510, 2014.
18. S.A. Henriksen, J.F.L. Pohlenz, *Acta Vet. Scan.* **22**, 594-596, 1981.
19. H.M. Gordon, H.V. Whitlock. in Ueno H., and Gonçalves P.C. (eds). *Manual para Helmitoses de Ruminantes* Japan International Cooperation Agency, Tokyo, 1939, pp. 50-52.
20. S.M. Franck, B.T. Bosworth, H.W. Moon, *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1795-1797, 1998.
21. A.A. Alfieri, M.E. Parazzi, E. Takiuchi, K.C. Medici, A.F. Alfieri, *Trop. Anim. Health Prod.* **38**, 521-526, 2006.
22. T.N.S. Medeiros, E. Lorenzetti, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, *Arch. Virol.* **160**, 447-451, 2015.
23. E. Takiuchi, D.T. Stipp, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, *J. Virol. Methods* **131**, 148-154, 2006.
24. J.R. Gentsch, R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das, M.K. Bhan, *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1365-1373, 1992.
25. V. Gouvea, R.I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H.F. Clark, B. Forrester, Z.Y. Fang, *J. Clin. Microbiol.* **28**, 276-282, 1990.
26. P. Maes, J. Matthijssens, M. Rahman, M. Van Ranst, *BMC Microbiol.* **9**, 238, 2009.
27. N. Decaro, G. Elia, M. Campolo, C. Desario, V. Mari, A. Radogna, M.L. Colaianni, F. Cirone, M. Tempesta, C. Buonavoglia, *J. Virol. Methods* **151**, 167-171, 2008.
28. R.W. Fulton, D.L. Step, J. Wahrmund, L.J. Burge, M.E. Payton, B.J. Cook, D. Burken, C.J. Richards, A.W. Confer, *Can. J. Vet. Res.* **75**, 191-199, 2011.
29. M.A. Barreiros, A.F. Alfieri, K.C. Medici, J.P. Leite, A.A. Alfieri, *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health* **51**, 104-109, 2004.

4.2 ARTIGO B

Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil

Artigo publicado na revista *Archives of Virology*



BRIEF REPORT

Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil

Juliane Ribeiro¹ · Selwyn Arlington Headley² · Jaqueline Assumpção Diniz¹ · Alfredo Hajime Tanaka Pereira² · Elis Lorenzetti^{1,3} · Amauri Alcindo Alfieri¹ · Alice Fernandes Alfieri^{1,3}

Received: 17 August 2016 / Accepted: 25 October 2016 / Published online: 25 November 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract This study presents the pathological, immunohistochemical, and molecular findings associated with the extra-intestinal detection of canine kobuvirus (CaKV) in a 5-month-old Chihuahua puppy, that had a clinical history of bloody-tinged feces. Principal pathological findings were interstitial pneumonia, necrotizing bronchitis, and parvovirus-induced enteritis. Molecular diagnostic methods identified CaKV within the cerebellum, cerebrum, lung, tonsil, and liver. CaKV and rotavirus were not identified within the feces and intestine. Immunohistochemistry (IHC) assays detected antigens of CDV and CAAdV-1 in the lungs. These results confirmed the extra-intestinal detection of CaKV in this puppy and represent the first extra-intestinal detection of CaKV in a dog.

Kobuviruses are officially classified into three species, *Aichivirus A* (human kobuvirus), *Aichivirus B* (bovine kobuvirus), and *Aichivirus C* (porcine kobuvirus) [15]. The viral genome encodes a leader (L) protein, as well as a

structural polyprotein (VP0, VP3, and VP1) and non-structural (2A-2C and 3A-3D) proteins [25]. The 3D segment of the kobuvirus genome is a conserved region, and the VP1 protein is the most variable, similar to other picornaviruses [21, 26].

Kobuviruses were identified in fecal samples from diarrheic and asymptomatic humans as well as in several animals. In Brazil, kobuviruses were initially detected in the fecal samples of pigs and sheep, and viral RNA was identified in the serum of pigs between 3 and 180 days-of-age [2]. Thereafter, the presence of *Aichivirus B* and *C* was identified in fecal samples of cattle [23] and pigs [22], respectively.

Canine kobuvirus (CaKV) was first described in fecal samples of dogs with gastroenteritis in the USA in 2011 [16], with subsequent reports in the UK [3], Italy [4], Korea [19], and China [17]. CaKV is frequently identified within fecal samples of animals with or without clinical signs of diarrhea [4]. There are few descriptions of coinfection due to CaKV and other viral agents: a recent study identified CaKV in association with a several agents including canine herpesvirus type 1 (CaHV-1), canine distemper virus (CDV), canine parvovirus (CPV), and canine adenovirus A types 1 (CAAdV-1) and 2 (CAAdV-2) in diarrheic and non-diarrheic dogs from Korea [19]. However, none of these studies have identified CaKV in the tissues of dogs. Consequently, the current study describes the first occurrence of CaKV in multiple tissues of a puppy from Southern Brazil, which was also coinfecting with other infectious disease agents.

In early March, 2015, an outbreak of diarrhea occurred at a kennel in the city of Colorado, Paraná State, Southern Brazil. The owner reported that seven 50-60-day-old Chihuahua puppies developed diarrhea, anorexia, and apathy with death occurring between 12-20 days after the onset of clinical manifestations. A necropsy on one of these

J. Ribeiro and S. A. Headley contributed equally towards the development of this manuscript.

✉ Amauri Alcindo Alfieri
alfieri@uel.br

¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitario, PO Box 10011, Londrina, PR 86057-970, Brazil

² Laboratory of Animal Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

³ Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

puppies, done elsewhere, revealed interstitial pneumonia and necrotizing hepatitis associated with intranuclear inclusion bodies in hepatocytes, and a diagnosis of infectious canine hepatitis was established.

In late July, 2015, the carcass of a 5-month-old puppy with a clinical history of abdominal pain, anorexia, and blood-tinged feces was submitted for routine necropsy. This puppy had received two doses of a commercial vaccine that contained eight immunogens (CDV, CPV-2, canine parainfluenza virus, canine adenovirus 1 and 2, canine coronavirus, and *Leptospira canicola* and *grippotyphosa* serovars.); the last dose being six weeks before spontaneous death. Several tissue fragments (liver, spleen, lung, cerebellum, cerebrum, mesenteric lymph node, kidney, heart, and intestine) were collected and routinely processed for histopathological evaluation. Selected formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue fragments of the liver and lung were used in immunohistochemistry (IHC) assays designed to detect the N protein of CDV (VMARD, Washington, USA), and with a commercial monoclonal antibody designed to identify CAcV-1 and CAcV-2 (VMARD, Washington, USA), using a previously described procedure [8]. Positive controls consisted of FFPE tissues from previous studies [9]; negative controls consisted of the diluents of the primary antibodies. Duplicates of the tissues cited above, as well as feces, were collected for parasitological and virological evaluations.

For virological investigation the tissues were processed using the MagNaLyser Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and the fecal samples were submitted to nucleic acid extraction as described elsewhere [1]. The nucleic acid was eluted in 50 µl of ultrapure RNase-free DEPC-treated sterile water. Negative (sterile water) and positive controls, consisting of viral nucleic acids (CAcV-1, CAcV-2, CDV, and CaHV-1) from previous cases [11, 12], as well as CPV2 commercial vaccine, were included in all nucleic acid extraction procedures.

The extracted nucleic acids were used in RT-PCR/PCR assays designed to amplify specific genes from viral agents known to infect dogs, including the: CDV N gene [5], CaHV-1 glycoprotein B gene [24], CPV VP2 gene [13], and the E gene of CAcV-1 and 2 [14].

The RT-PCR assay to detect CaKV is designed to amplify a 216 bp region of the RdRp gene [20]. The partial region of the VP1 protein CaKV was amplified by using the primer pairs VP1-DogF (5'-CAAHCTKGAR-AACTTCTTCTC-3') and VP1-DogR (5'-GAAGTTKGA-GAGCATCTGKC-3'), which were designed using the complete sequences of human, canine, and feline kobuvirus available in GenBank.

The intestine and the fecal samples were used in RT-PCR assays designed to identify rotavirus species A, B, and C [18]. All RT-PCR and PCR products were analyzed by

electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Two RT-PCR products of the RdRp gene and the VP1 region of CaKV were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), quantified in a Qubit® Fluorometer (Invitrogen Life Technologies), and sequenced in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit using the forward and reverse primers used in the RT-PCR assay (Applied Biosystems). The phylogenetic tree and the nt identity matrix were developed using the MEGA 6.0 and BioEdit 7.2.5, respectively. The analyses were based on the neighbor-joining method and the Kimura 2-parameter model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The referenced sequences included in this study were acquired from GenBank.

The most remarkable pathological alterations were observed in the lungs and consisted of discrete necrosis of bronchiolar and bronchial epithelial cells associated with small basophilic intranuclear inclusion bodies within some of these cells, severe diffused interstitial pneumonia, in addition to pulmonary congestion and edema. The intestinal lesions were suggestive of parvovirus enteritis. Other significant pathological findings included necrotizing myocarditis and lymphoid depletion of the spleen and tonsils.

Immunohistochemistry revealed the detection of the antigens of CDV within the bronchiole and bronchiolar epithelium (Fig. 1A) and antigens of CAcV-1 within the cytoplasm of endothelial cells (Fig. 1B); antigens of CAcV-1 and -2, and CDV were not identified in the liver. Examples of *Giardia* spp. were identified by the floating technique from the fecal sample of the puppy.

The distribution of the viral nucleic acids identified within multiple tissues and the feces of the puppy are given in Table 1. Specific fragments of the genes of CDV, CaKV, CPV-2, and CaHV-1 were amplified from multiple tissues. Mixed infections associated with CaKV were identified in the cerebrum, lung, and tonsils. In addition, nucleic acid from CPV-2 was identified within fragments of the small intestine and a single infection associated with CaKV was also detected in the cerebellum and liver. Further, the fecal sample of the puppy contained CPV-2 DNA. The nucleic acids of all other viral agents evaluated, including rotavirus species A, B, and C, were not amplified.

The partial sequences of CaKV VP1 and RdRp genes identified in this study have been deposited in GenBank (Accession numbers: VP1: brain KX465093, lung KX465094; RdRp: lung, KX465095; tonsil KX465096). The phylogenetic analysis of the RdRp region (nt 201) showed that the CaKV strains from the lung and tonsil of this dog grouped with other strains of CaKV previously described (Fig. 2A), and they exhibited higher nt sequence

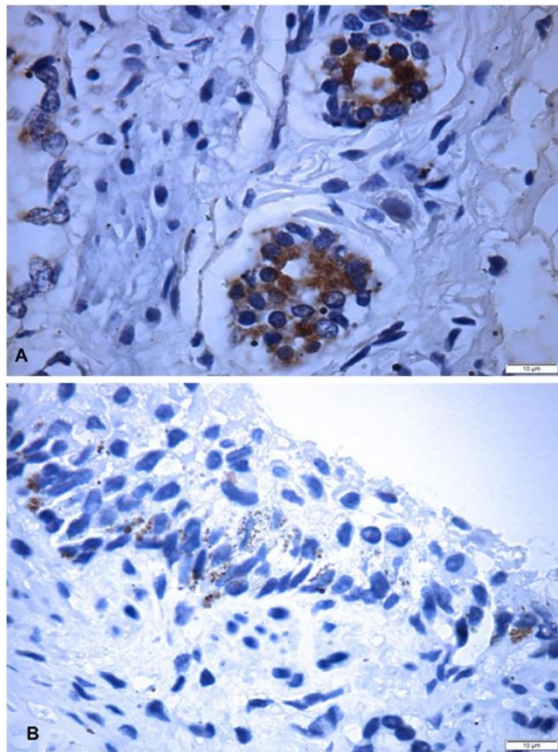


Fig. 1 Immunohistochemical demonstration of antigens of canine adenovirus-1 (A) and canine distemper virus (B) in the lung of a puppy infected with canine kobuvirus. Immunoperoxidase; Bar=10 µm

identity (95 to 96%) with canine than with mouse (88%) and human (80 to 83%) kobuvirus strains.

Moreover, the phylogenetic analysis of the VP1 region (nt 303) revealed that the CaKV strains identified in the lung and cerebrum of this dog clustered with other strains of CaKV and mouse kobuvirus. In addition, no phylogenetic difference was observed between strains of *Aichivirus A*, since those derived from dogs, mouse, and humans,

clustered within the same group (Fig. 2B). Further, the VP1 CaKV strains from the present study showed 85.2~92%, 91.5~100%, 71% nt identity; and 73.6%, 65.6~67.6%, and 62.1% amino acid similarity with dog, mouse, and human kobuvirus strains, respectively.

The unique finding of this investigation was the amplification of the nucleic acid of CaKV from multiple tissues of this puppy, using two RT-PCR assays. These results contrast with previous descriptions of CaKV, where nucleic acids were detected exclusively in the feces of diarrheic dogs [4, 16, 19]; however, these studies did not evaluate the presence of CaKV in tissues. Surprisingly, CaKV was not detected in the feces or the intestinal fragment of this puppy using the RT-PCR assay applied during this study. Alternatively, a more sensitive assay might be required to detect this virus when there is concomitant infection with other severe intestinal diseases, such as those associated with CPV-2 and *Giardia* spp. Nevertheless, these findings confirm the detection of CaKV in this dog, and represent the first description of canine kobuvirus in Brazil.

It must be highlighted that coinfections of CaKV with other viral agents were identified in several tissues/organs, including the cerebrum, lung, and the tonsils (Table 1); and there was concomitant parvovirus enteritis and giardiasis. Mixed infections in dogs have been previously related with descriptions of simultaneous viral, bacterial, and parasitic agents [10, 11], as well as mixed infections with multiple viral agents [12].

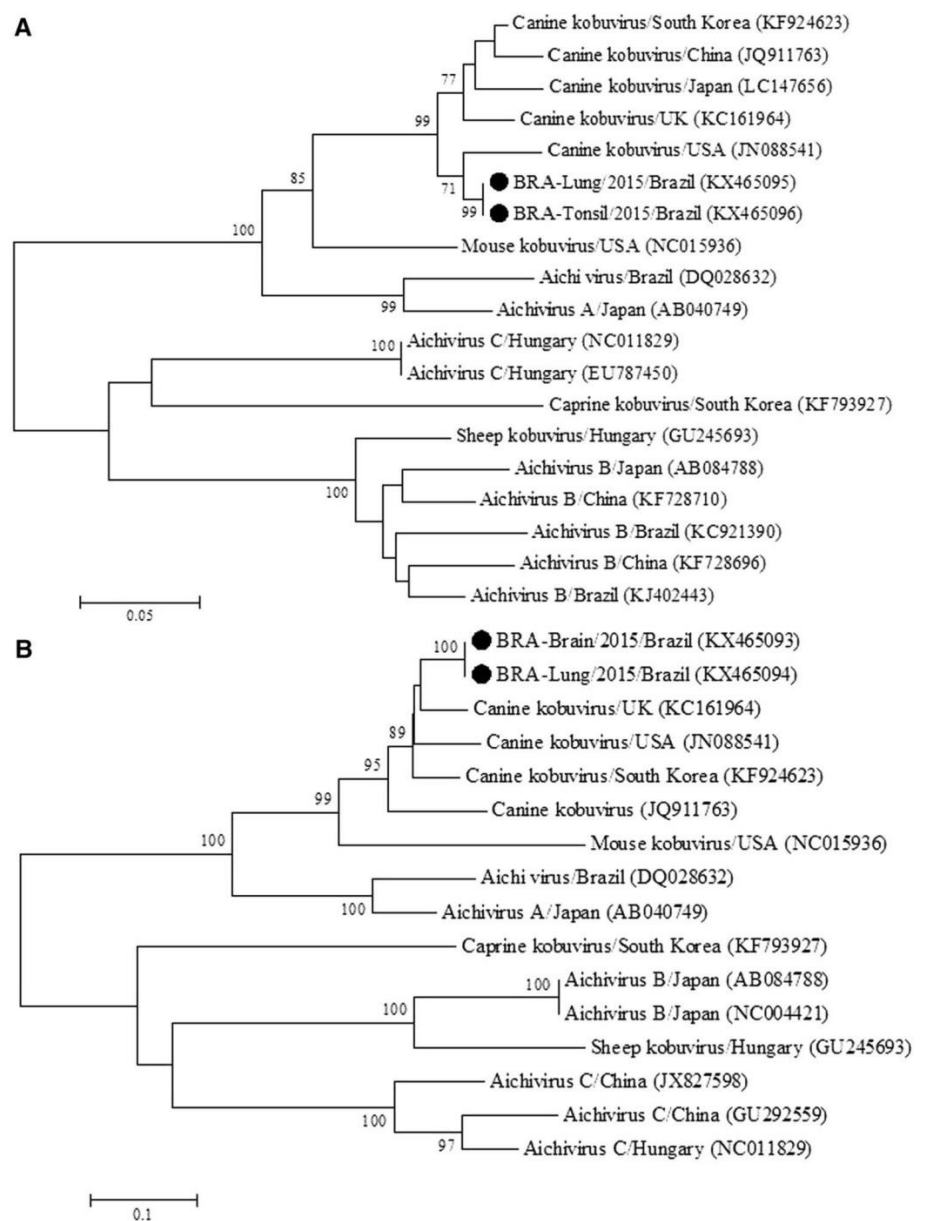
Coinfections with CaKV and other infectious agents in dogs, as observed in this investigation, have been described in diarrheic outbreaks [19], although the pathogenic effect of CaKV is unclear. Interestingly, we have identified CaKV with concomitant infections related to CDV (by RT-PCR and IHC) and CAdV-1 (only by IHC) in the lung of this dog and associated with necrotizing bronchiolitis, interstitial pneumonia, as well as pulmonary congestion and edema. Interstitial pneumonia is a typical pulmonary

Table 1 Detection of viral nucleic acids amplified from multiple tissues and the feces of a diarrheic dog

Tissues	Viral agents						
	CDV	CPV-2	CaHV-1	CAdV-1	CAdV-2	CaKV	RV
Cerebrum	+	-	-	-	-	+	n.d.*
Cerebellum	-	-	-	-	-	+	n.d.
Lung	+	-	-	-	-	+	n.d.
Tonsil	-	-	+	-	-	+	n.d.
Kidney	-	-	+	-	-	-	n.d.
Liver	-	-	-	-	-	+	n.d.
Small intestine	-	+	-	-	-	-	-
Feces	-	+	-	-	-	-	-

n.d.: not done

Fig. 2 Phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence (nt 201) of the RdRp gene (a) and partial region of the VP1 protein (nt 303) of canine kobuvirus (CaKV) (b). The strains of CaKV identified during this study are marked with a filled circle



manifestation of infection due to CDV and CA Δ V-1 [11, 12]. CDV produces interstitial pneumonia due to the viral tropism for epithelial cells of the pulmonary alveoli, while CA Δ V induces the same lesions due to alteration of the integrity of the vascular endothelium of the alveolar wall [7]. However, interstitial pneumonia was also described in pigs experimentally infected with porcine kobuvirus [27], so it is possible that CaKV could have been associated with the pulmonary infection observed in this dog.

Additionally, the presence of kobuvirus is frequently associated with an initial infection induced by other

infectious agents. In this case, there were concomitant coinfections caused by CPV-2 and CDV; these are well known immunosuppressive infectious pathogens [6] that facilitate the entry and colonization of secondary agents. Therefore, we believe that the multiple coinfections observed in this puppy might be related to the immunosuppression induced by CDV and CPV-2, and worsened with the concomitant giardiasis.

Furthermore, widespread viral dissemination was demonstrated in multiple tissues as CaKV nucleic acids were detected in the liver, lung, brain, and tonsils of this

puppy. These findings complement a previous investigation by our group, where kobuvirus was identified in the sera of pigs of various ages with and without clinical signs of diarrhea [2]. The phylogenetic analysis of the conserved RdRp region of the CaKV described in this study revealed higher nt sequence identity between canine (95%–96%), mouse (88%), and human (80%–83%) kobuvirus strains. The sequence analysis of the VP1 protein, considered the most variable protein in this virus, obtained from the brain and pulmonary fragments were identical to each other and had 85.2~92%, 91.5~100%, 71% nt identity; and 73.6%, 65.6~67.6%, and 62.1% amino acid similarity with dog, mouse, and human kobuviruses, respectively. Moreover, these strains of kobuvirus grouped within the same cluster during phylogenetic evaluation.

In conclusion, CaKV genomes were identified in multiple tissues from a puppy that was coinfecting with other viral and parasitic agents, confirming the systemic distribution of kobuvirus in this puppy. Although the role of CaKV in the etiopathogenesis of disease is obscure, there is evidence that pathological alterations might have occurred. Finally, the phylogenetic analysis confirmed that the strains of CaKV identified during this investigation are similar to those described in other geographical locations. These findings represent the first characterization of CaKV in the tissues of a puppy.

Acknowledgements This study was supported by the following Brazilian institutes: CNPq – grant number 305062/2015-8), CAPES and FINEP. S.A. Headley, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, and E. Lorenzetti are recipients of CNPq and Araucaria Foundation (FAP/PR) fellowships, respectively.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Supervision of the ethical committee to conduct this study was not required because this work was conducted with organ fragments of an animal that died spontaneously and was submitted for routine diagnosis by the owner. All applicable international, and national guidelines for the care and use of animals was followed.

References

- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Tropic Animal Health Product* 38:521–526
- Barry AF, Ribeiro J, Alfieri AF, van der Poel WH, Alfieri AA (2011) First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. *Infect Genet Evol* 11:1811–1814
- Carmona-Vicente N, Buesa J, Brown PA, Merga JY, Darby AC, Stavisky J, Sadler L, Gaskell RM, Dawson S, Radford AD (2013) Phylogeny and prevalence of kobuviruses in dogs and cats in the UK. *Veter Microbiol* 164:246–252
- Di Martino B, Di Felice E, Ceci C, Di Profio F, Marsilio F (2013) Canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in Italy. *Veter Microbiol* 166:246–249
- Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgartner W (1999) Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol* 37:3634–3643
- Greene CE, Decaro N (2012) Canine viral enteritis. In: Greene CE (ed) *Infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier, Saint Louis, pp 67–80
- Greene CE, Vandeveld M (2012) Canine distemper. In: Greene CE (ed) *Infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier, St Louis, pp 25–42
- Headley SA, Soares IC, Graca DL (2001) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. *J Comp Pathol* 125:90–97
- Headley SA, Amude AM, Alfieri AF, Bracarense AP, Alfieri AA, Summers BA (2009) Molecular detection of Canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *J Vet Diagn Invest* 21:588–597
- Headley SA, Shirota K, Baba T, Ikeda T, Sukura A (2009) Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. *Vet Pathol* 46:151–154
- Headley SA, Alfieri AA, Fritzen JTT, Garcia JL, Weissenböck H, da Silva AP, Bodnar L, Okano W, Alfieri AF (2013) Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *J Vet Diagn Invest* 25:129–135
- Headley SA, Bodnar L, Silva AP, Alfieri AF, Gomes LA, Okano W, Alfieri AA (2015) Canine distemper virus with concomitant infections due to canine herpesvirus-1, canine parvovirus, and canine adenovirus in puppies from Southern Brazil. *J Microbiol Pathol* 1:015
- Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki JT (2007) Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19:535–539
- Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z (2001) Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet Res Commun* 25:77–84
- ICTV (2016) International Committee on Taxonomy of Viruses <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Accessed 14 April 2016
- Kapoor A, Simmonds P, Dubovi EJ, Qaisar N, Henriquez JA, Medina J, Shields S, Lipkin WI (2011) Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. *J Virol* 85:11520–11525
- Li C, Wei S, Guo D, Wang Z, Geng Y, Wang E, Zhao X, Su M, Wang X, Sun D (2016) Prevalence and phylogenetic analysis of canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in northeast China. *J Vet Med Sci* 78:7–11
- Médici KC, Barry AF, Alfieri FA, Alfieri AA (2011) Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Swine Health Product* 19:146–150
- Oem JK, Choi JW, Lee MH, Lee KK, Choi KS (2014) Canine kobuvirus infections in Korean dogs. *Arch Virol* 159:2751–2755
- Reuter G, Boldizsar A, Pankovics P (2009) Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Arch Virol* 154:101–108
- Reuter G, Boros A, Pankovics P (2011) Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol* 21:32–41
- Ribeiro J, de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alfieri AA (2013) High frequency of Aichivirus C (porcine kobuvirus) infection in piglets

- from different geographic regions of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 45:1757–1762
23. Ribeiro J, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Kobuvirus (Aichivirus B) infection in Brazilian cattle herds. *Vet Res Commun* 38:177–182
 24. Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberle C, Brunet S, Poulet H (2005) Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 64:61–74
 25. Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, Miyamura T, Yamazaki S (1998) Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol* 72:8408–8412
 26. Yamashita T, Ito M, Kabashima Y, Tsuzuki H, Fujiura A, Sakae K (2003) Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J Gen Virol* 84:3069–3077
 27. Yang F, Liu X, Zhou Y, Lyu W, Xu S, Xu Z, Zhu L (2015) Histopathology of Porcine kobuvirus in Chinese piglets. *Virologica Sinica* 30:396–399

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- A grande proporção (54,2%, 13/24) de diagnóstico de *Aichivirus B* em fezes diarreicas de bezerros, em associação com os resultados negativos obtidos nas amostras provenientes de animais assintomáticos, sugere que esse vírus esteja relacionado à etiologia do surto de diarreia neonatal ocorrido em um rebanho leiteiro de alta produção do Estado do Paraná;
- Com relação à faixa etária, o RNA de *Aichivirus B* foi identificado somente em amostras fecais diarreicas de bezerros com até 14 dias de idade elevando, com isto, a taxa de amostras positivas nessa categoria animal para 83,3% (10/12);
- Com relação ao gene RdRP as cepas brasileira de *Aichivirus B* apresentaram 90,7 a 92,1% de identidade de nucleotídeos com cepas descritas em países asiáticos como Coreia, China e Japão;
- De acordo com o sistema proposto em 2014 para classificação das cepas de *Aichivirus B* em Linhagens ou Genotipos, tendo como base sequências específicas do gene que codifica a proteína VP1, as cepas brasileiras foram agrupadas, juntamente com cepas japonesas, no *cluster* que contém cepas classificadas na Linhagem 1 (Genotipo A);
- Este é o primeiro estudo que relacionou a presença de *Aichivirus B* e a ocorrência de um surto de diarreia neonatal em bovinos e também a primeira proposta de classificação de cepas de *Aichivirus B* em Linhagens (Genotipos) realizado com cepas de origem bovina provenientes da América do Sul;
- Por meio da técnica de RT-PCR não foi possível identificar a presença de RNA de kobuvírus em fezes e em fragmento de intestino do filhote de cão. Em contrapartida, essa técnica foi positiva para kobuvírus quando foram avaliados fragmentos de órgãos como cérebro, cerebelo, tonsila, pulmão e fígado;
- A histopatologia revelou alterações patológicas como pneumonia intersticial, bronquite necrosante, miocardite, enterite induzida por parvovírus e depleção linfóide;

- A imuno-histoquímica identificou antígenos do vírus da cinomose e do adenovírus canino tipo 1 em várias regiões pulmonares;
- A técnica de PCR revelou infecção singular por parvovírus canino tipo 2 apenas no intestino;
- Em todos os outros órgãos avaliados as técnicas moleculares empregadas possibilitaram a caracterização de infecções mistas ocasionadas por kobuvírus canino e vírus da cinomose canina, parvovírus canino tipo 2 e herpesvírus canino tipo 1;
- A análise filogenética realizada na região conservada do gene RdRP das cepas brasileiras revelou alta identidade de nucleotídeos entre cepas de kobuvírus canino descritas na Ásia (Coréia, China e Japão), Europa (Reino Unido) e América do Norte (EUA);
- A análise filogenética realizada na região genômica mais variável dos picornavírus, (proteína VP1 do capsídeo viral), também possibilitou o agrupamento das cepas brasileiras de kobuvírus canino no mesmo *cluster* de cepas descritas no Reino Unido, EUA e Coréia;
- Os resultados desse estudo confirmam a detecção extra-intestinal de kobuvírus canino em um filhote de cão e representa a primeira descrição extra-intestinal desse vírus em cães;
- No conjunto, os experimentos conduzidos nesse estudo adicionaram novos conhecimentos sobre aspectos clínicos e moleculares da infecção por kobuvírus em animais.

ANEXOS

ANEXO A:

Lista de Reagentes

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

26. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
27. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
28. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
29. Oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) Reverse - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
30. Oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) Forward - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])

ANEXO B:**Soluções e Tampões****• Hidratação da sílica**

- 12 g de sílica (O_2Si)
- Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água ultrapura autoclavada
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 μ L de HCl para ajustar o pH=2,0)
- liquotar e autoclavar

• Solução L6

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

• Solução L2

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

• Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose

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

• Fenol/clorofórmio álcool isoamílico

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

•

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 50 mL
- **Gel de agarose 2%**
 - 1 g agarose
 - 50 mL de tampão TEB 1x
 - 30 μ L de brometo de etídio
- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque - concentração 100 mM - 100 μ L de cada dNTP
 - solução uso - concentração 10 mM - 10 μ L da solução estoque + 90 μ l de água ultrapura autoclavada

Tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2)

- 2 g de NaCl
- 0,05 g de KCl
- 0,355 g de Na_2HPO_4
- 0,068 g de KH_2PO_4
- Água bidestilada q.s.p. 250 mL

Tampão de corrida TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x (pH 8,4)

- 0,89 M de TRIS
- 0,89 M de ácido bórico
- 0,02 M de EDTA 0,2 M pH 8,0
- Água bidestilada qsp. 1 L

Tampão de amostra

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose-sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%

ANEXO C:

Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal - Extração bruta**

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

- **Suspensão a partir de amostras de órgãos**

- Macerar 100 µg do órgão em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 500 µL de PBS
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 1000 g por 5 min
- Recolher o sobrenadante e guardar o macerado a -80°C

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

- Aliquotar 500 µL da suspensão fecal
- Adicionar 50 µL de SDS 10 %
- Para órgãos adicionar 10 µL de Proteinase K
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /10 min

Recolher o sobrenadante em outro microtubo de 1,5 mL

- Adicionar 500 μ L da solução L6
- Adicionar 25 μ L 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 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o *pellet* em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
- Adicionar 50 μ L de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56°C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g /4 min

- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
 Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

- **RT-PCR para a região RdRP e para a proteína VP1 do aichivírus B e kobuvírus canino**

Desnaturação

- 5 μ L do RNA extraído
 - 20 pmol do *primer reverse*

Programa: 97°C por 5 min e banho de gelo por 5 min

Transcrição reversa

-Buffer 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4,0 μ L
 -DTT (0,1 M): 2,0 μ L
 -dNTP (0,1 mM): 1,0 μ L
 -M-MLV (200 U/ μ L): 0,5 μ L
 -Água: 2,5 μ L

Programa: 37°C/30 min; 70°C/15 min.

- **Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para kobuvírus**

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

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 40 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 51°C/1 min e 20 segundos (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/10 min (extensão final).

- **PCR para glicoproteína B de herpesvírus canino**

- 1x PCR *buffer* (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
 - 2,5 mM MgCl₂
 - 1,6 mM de cada dNTP

- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 2,5 μ L de cDNA
- Água q.s.p. 25 μ L

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 49°C/30 s (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/10 min (extensão final).

- **PCR para gene E do Adenovírus canino tipo 1 e 2**

- 1x PCR *buffer* (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3,1 mM MgCl₂
- 1,6 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 2,5 μ L de cDNA
- Água q.s.p. 25 μ L

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 32 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 58°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/5 min (extensão final).

- **PCR para VP2 do Parvovírus canino tipo 2**

- 1x PCR *buffer* (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3,1 mM MgCl₂
- 0,8 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 3 μ L de cDNA
- Água q.s.p. 25 μ L

Programa: 94°C/10 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 50°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/10 min (extensão final).

- **RT-PCR para gene N do vírus da cinomose canina**

Desnaturação

- 9 μ L do RNA extraído
- 20 pmol do primer *forward*

Programa: 70°C por 10 min e banho de gelo por 5 min

Transcrição reversa

- 1x RT *buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 1,3 mM de cada dNTP
- 0,1 M de DTT
- 50 unidades de transcriptase reversa M-MLV

Programa: 37°C/50 min; 70°C/15 min.

PCR

- 1x PCR *buffer* (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3 mM MgCl₂
- 0,8 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 5 µL de cDNA 61
- Água q.s.p. 50 µL

Programa: 94°C/1 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/1 min (desnaturação), 59°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/5 min (extensão final).

- **RT-PCR para rotavírus A (genótipos P (VP4) e G (VP7))**

Desnaturação P

- 5 µL do RNA extraído
- 20 pmol do *primer forward* con 3 = 1 µL
- 20 pmol do *primer reverse* con 2 = 1 µL
- Água 3 µL

Programa: 97°C/7 min e banho de gelo 5 min.

Desnaturação G

- 5 µL do RNA extraído
- 20 pmol do *primer forward* Beg 9
- 20 pmol do *primer reverse* End 9
- Água 3 µL

Programa: 97°C/7 min e banho de gelo 5 min.

Transcrição reversa

- Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL

- MgCl₂ 50 mM - 2,5 µL
- dNTP 2,5 mM - 4,0 µL
- SuperScript II*[®] 200U/µL - 0,15 µL
- Água - 5,85 µL

Programa: 42°C por 30 min

- **PCR P tipo (VP4) / G (VP7)**

- Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL
- dNTP 2,5 mM - 4µL
- Platinum[®]Taq DNA Polymerase* 5U/µL - 0,25 µL
- Primer con 2 reverse* (20 pmol) - 1 µL / *Primer Beg 9* (20 pmol) - 1 µL
- Primer con 3 forward* (20 pmol) - 1 µL / *Primer End 9* (20 pmol) - 1 µL
- Água - 16,25 µL

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 40 ciclos de 94°C/30 segundos (desnaturação), 42°C/30 segundos (anelamento) e 72°C/45 segundos (extensão); 72°C/7 min (extensão final).

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

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

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

- Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel
- Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min
- Spin*
- Transferir 600 µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um microtubo coletor com coluna
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13.000 g / 2 min
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo microtubo
- Adicionar 500 µL do *Wash buffer type 1* na coluna com microtubo coletor
- Centrifugar a 13.000 g / 1 min

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

- Adicionar 30 μL do *Elution buffer type 6*
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13.000 g / 1 min
- Estocar o DNA purificado em -20°C

- **Quantificação de produto de PCR**

- Preparar a solução *Quant-iTTM Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iTTM* no *Quant-iTTM Buffer*, 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
- Homogeneizar em vórtex
- No microbuto das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution 2* a 2 μL do DNA purificado
- No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0
- No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100
- Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2 – 3 s
- Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
- Realizar a leitura utilizando *QubitTM fluorometer* (Invitrogen Life TechnologiesTM)
- Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

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 6.6

(<http://www.megasoftware.net/mega6/mega6.6.html>)

- BioEdit software version 7.2.5

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

ANEXO E**Normas do periódico *Virus Genes* para formatação**

http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/11262?print_view=true&detailsPage=pltc_1630109