



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA POSSATTI

**TREMOR CONGÊNITO EM LEITÕES RECÉM-NASCIDOS E
A INFECÇÃO POR PESTIVÍRUS SUÍNO ATÍPICO**

Londrina
2018

FLÁVIA POSSATTI

**TREMOR CONGÊNITO EM LEITÕES RECÉM-NASCIDOS E
A INFECÇÃO POR PESTIVÍRUS SUÍNO ATÍPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2018

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

Possatti, Flávia.

Tremor congênito em leitões recém-nascidos e a infecção por pestivirus suíno atípico / Flávia Possatti. - Londrina, 2018.
64 f.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. APPV - Tese. 2. Desmielinização - Tese. 3. Histopatologia - Tese. 4. Leitões - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

FLÁVIA POSSATTI

**TREMOR CONGÊNITO EM LEITÕES RECÉM-NASCIDOS E A
INFECÇÃO POR PESTIVÍRUS SUÍNO ATÍPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof.^a Dr.^a Michele Lunardi
Universidade de Cuiabá – UNIC

Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude
Universidade de Cuiabá – UNIC

Prof.^a Dr.^a Elis Lorenzetti
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 21 de dezembro de 2018.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e no Laboratório Multiusuário em Saúde Animal – Unidade de Biologia Molecular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora 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, por ser minha fonte de força diária, principalmente na fase final desta etapa.

Aos professores Alice e Amauri Alfieri pela oportunidade que me deram de realizar o mestrado e doutorado sob suas orientações, por todo o conhecimento transferido e pela paciência que tiveram mesmo nos momentos de dificuldade.

Aos técnicos do Laboratório de Virologia Animal, Juliana, Marcos e Renilda por toda dedicação à rotina diária do laboratório que possibilita a realização dos nossos projetos. Aos estagiários, residentes, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos pela convivência, conversas, apoio e colaboração em todos estes anos. Agradeço principalmente à Bruna e Elis pela amizade. Agradeço especialmente à Alais pela amizade, troca de conhecimento e ajuda na execução do projeto. Por último, agradeço à pessoa mais importante, Raquel, pela amizade, compreensão, ajuda e por ser meu anjo da guarda no momento que mais precisei.

Ao professor Dr. Everson Zotti pela colaboração no projeto.

Ao professor Selwyn e a doutoranda Thalita do Laboratório de Patologia Animal que foram extremamente fundamentais ao desenvolvimento do projeto e redação dos artigos, pela disponibilidade sempre que foi necessário.

À secretária Helenice, à coordenadora prof.^a Ana Paula pela dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e aos funcionários do DMVP.

A todos os professores e colegas do doutorado com quem tive a oportunidade de adquirir muito conhecimento.

Aos meus pais, Vilmar e Clarice e meu irmão Matheus, por serem meu porto seguro, por todo apoio e incentivo neste período. Aos meus demais familiares que também sempre se preocuparam e me incentivaram a ser a primeira doutora da família.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

POSSATTI, Flávia. **Tremor congênito em leitões recém-nascidos e a infecção por pestivírus suíno atípico**. 2018. 64 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

Pestivírus suíno atípico (APPV) tem sido associado ao tremor congênito (TC) tipo A-II em leitões neonatos. Apesar do número de estudos sobre o APPV ter aumentado, as alterações histopatológicas, bem como outros aspectos relativos à caracterização antigênica e molecular do vírus e aspectos epidemiológicos da infecção em leitões ainda são pouco descritos. O objetivo do primeiro estudo foi descrever os achados patológicos e moleculares associados à infecção simultânea de APPV e teschovírus suíno (PTV) em leitões com manifestações clínicas de TC provenientes de um rebanho do estado do Paraná com altas taxas de letalidade em animais recém-nascidos. Em 2017, foram relatados casos de TC em leitegadas com alta letalidade neonatal em um rebanho paranaense e três leitões da mesma leitegada que morreram espontaneamente foram enviados para diagnóstico. As principais alterações patológicas encontradas em todos os leitões foram desmielinização secundária e hipomielinização no cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal confirmadas por histopatologia e coloração *Luxol Fast Blue*. Alterações histopatológicas adicionais incluíram necrose neuronal multifocal, neuronofagia e gliose encontrados no córtex cerebral e medula espinhal e enterite atrófica de todos os leitões e edema no mesocólon de um deles. RNA de APPV e de PTV foi detectado por *nested*-RT-PCR no sistema nervoso central (SNC) dos leitões afetados, sendo que PTV também foi detectado no intestino e nas fezes. As alterações patológicas e os resultados moleculares demonstram que os leitões avaliados apresentavam infecção por APPV e PTV, o que pode ter ocasionado a alta letalidade (100%) de leitões recém-nascidos identificada nesse caso. No segundo estudo foram descritas as características histopatológicas da infecção espontânea singular por APPV em quatro leitões com sinais clínicos de TC. Os quatro leitões de dois dias de idade com TC foram avaliados por histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e análise molecular. As principais alterações histopatológicas no encéfalo e medula espinhal incluíram necrose neuronal, gliose, neuronofagia, satelitose, desmielinização, degeneração walleriana e necrose de células de purkinje. Na IHQ, realizada com o objetivo de detectar a proliferação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em áreas afetadas do encéfalo e medula espinhal, demonstrou que a proliferação de células GFAP positivas e fibras era predominante em leitões com TC infectados com APPV em relação a leitões assintomáticos não infectados da mesma idade. As reações de *nested*-RT-PCR identificaram RNA de APPV no cérebro, cerebelo e tronco cerebral de todos os leitões, enquanto outros vírus (teschovírus suíno, sapelovírus suíno e vírus *Seneca Valley*) conhecidos por induzir sinais clínicos semelhantes não foram identificados. Estes resultados sugerem que as alterações histopatológicas induzidas pela infecção singular por APPV nos leitões avaliados são predominantemente degenerativas e necróticas e correlacionadas com as alterações identificadas no primeiro estudo. Com estes resultados podemos sugerir que a necrose neuronal, a gliose, a neuronofagia e a satelitose possam ser consideradas características histológicas importantes da infecção induzida por APPV em leitões recém-nascidos com sinais clínicos de TC.

Palavras-chave: APPV. Desmielinização. Histopatologia. Leitões. Mioclonia.

POSSATTI, Flávia. **Congenital tremor in newborn piglets and atypical porcine pestivirus infection**. 2018. 64 p. Thesis (PhD Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

ABSTRACT

Atypical porcine pestivirus (APPV) has been associated with congenital tremor (CT) type A-II in neonatal piglets. Although the number of APPV-based studies is increasing, the histopathological alterations and other aspects related to the antigenic and molecular characterization of the virus and epidemiological aspects of the infection in piglets are still underreported. The objective of the first study was to describe the pathological and molecular findings associated with simultaneous infection of APPV and porcine teschovirus (PTV) in piglets with clinical manifestations of CT from a herd of Paraná State with high rates of lethality in newborn piglets. In 2017, CT cases were reported in litters with high neonatal mortality in a pig herd from Paraná and three piglets from the same litter that died spontaneously were sent for diagnosis. The main pathological alterations in all piglets were secondary demyelination and hypomyelination at the cerebellum, brainstem and spinal cord confirmed by histopathology and luxol fast blue–cresyl violet stain. Additional histopathological alterations included multifocal neuronal necrosis, neuronophagia and gliosis found in the cerebral cortex and spinal cord of all piglets, and atrophic enteritis in all piglets and mesocolonic oedema in one piglet. APPV and PTV RNA was detected by nested-RT-PCR in the central nervous system of affected piglets, and PTV was also detected in the intestine and faeces. The pathological alterations and molecular results together suggested that the piglets evaluated had a dual infection by APPV and PTV, which probably was the cause of the high lethality (100%) of newborn piglets identified in this case. In the second study the histopathologic features of singular spontaneous APPV infection in four piglets with clinical signs of CT were described. Four two-day-old piglets with CT were evaluated by histopathology, immunohistochemistry (IHC), and molecular assay. The main histopathologic alterations at the brain and spinal cord included neuronal necrosis, gliosis, neuronophagia, satellitosis, demyelination, Wallerian degeneration, and Purkinje cell necrosis. In the IHC assay, performed to detect the proliferation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in affected areas of the brain and spinal cord revealed that the proliferation of GFAP+ cells and fibers was predominant in APPV-infected piglets relative to asymptomatic piglets of the same age group. The nested-RT-PCR assays identified APPV RNA in the cerebrum, cerebellum, and brainstem of all piglets, while other viruses (PTV, PSV, SVV) known to induce similar clinical signs were not identified. These results suggested that the histopathological alterations induced by singular APPV infection are predominantly degenerative and necrotic and correlate with alterations identified in the first study. With these results we can suggest that neuronal necrosis, gliosis, neuronophagia, and satellitosis should be considered as important histologic features of APPV-induced infection in newborn piglets with clinical signs of CT.

Keywords: APPV. Demyelination. Histopathology. Piglets. Myoclonia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Árvore filogenética do gênero Pestivirus com a nova nomenclatura das espécies, construída com base na sequência de aminoácidos de um fragmento da poliproteína 17
- Figura 2** - Esquema demonstrando a organização do genoma de representantes do gênero Pestivirus 18

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Classificação e etiologia do tremor congênito em leitões..... 15
- Quadro 2** - Nomenclatura atual e antiga das espécies do gênero Pestivirus e as espécies animais suscetíveis 16

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	<i>Amino acid</i> (Aminoácido)
APPV	<i>Atypical porcine pestivirus</i> (Pestivirus suíno atípico)
BDV	<i>Border disease virus</i> (Vírus da doença da fronteira)
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i> (Vírus da diarreia viral bovina)
cDNA	DNA complementar
CSFV	<i>Classical swine fever virus</i> (Vírus da peste suína clássica)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
IHQ	Imunohistoquímica
Kb	Quilobases
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
Pb	Pares de base
PCV-2	<i>Porcine circovirus 2</i> (Circovírus suíno 2)
PSV	<i>Porcine sapelovirus</i> (Sapelovírus suíno)
PTV	<i>Porcine teschovirus</i> (Teschovírus suíno)
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
RT-qPCR	RT-PCR quantitativo
SNC	Sistema nervoso central
SVV	<i>Seneca Valley virus</i>
TC	Tremor congênito
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	TREMOR CONGÊNITO	14
2.1	GÊNERO <i>PESTIVIRUS</i>	15
2.2	PESTIVÍRUS SUÍNO ATÍPICO.....	19
2.2.1	Diagnóstico	20
2.2.2	Epidemiologia.....	21
3	REFERÊNCIAS	25
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	ARTIGO 1	31
6	ARTIGO 2	38
7	CONCLUSÕES	42
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	ANEXOS	44
	ANEXO A - Lista de reagentes	45
	ANEXO B - Soluções e Tampões	47
	ANEXO D - Lista de <i>softwares</i>	64

1 INTRODUÇÃO

Em 2015, foi descrito pela primeira vez o pestivírus suíno atípico (*Atypical porcine pestivirus* - APPV), identificado por sequenciamento de DNA de nova geração (NGS) em amostras de soros de suínos (HAUSE et al., 2015). Inicialmente, o vírus não foi associado a qualquer manifestação clínica, posteriormente, um estudo de inoculação experimental conduzido nos Estados Unidos da América (EUA) demonstrou que APPV estava associado à ocorrência de tremor congênito (TC) em leitões neonatos (ARRUDA et al., 2016).

Atualmente, relatos da ocorrência de APPV associado ao TC foram realizados na Alemanha (POSTEL et al., 2016), Áustria (SCHWARZ et al., 2017), Canadá (DESSUREAULT et al., 2018), China (ZHANG et al., 2017), Espanha (MUÑOZ-GONZALEZ et al., 2017), Holanda (DE GROOF et al., 2016) e Hungria (DÉNES et al., 2018). No Brasil, no ano de 2018 APPV foi descrito em leitões com TC, nas regiões Sul e Sudeste (GATTO et al., 2018; MÓSENA et al., 2018; POSSATTI et al., 2018a; POSSATTI et al., 2018b).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TREMOR CONGÊNITO

Tremor congênito é uma doença neonatal de leitões, caracterizada por espasmos musculares, localizados ou generalizados, observados dentro de poucas horas após o nascimento. Os sinais clínicos podem ser moderados como tremor de orelha, flanco ou membros pélvicos. Já os sinais mais graves incluem tremores generalizados que resultam em dificuldade de permanecer em pé ou caminhar e, conseqüentemente, incapacidade de mamar, o que pode levar à morte devido à desnutrição (YUAN et al., 2017).

Duas classificações são utilizadas para o TC, sendo que quando não há lesões histopatológicas a doença é classificada como tipo B e quando há desmielinização no sistema nervoso central (SNC) é classificada como tipo A. O tipo A, por sua vez, é subdividido de acordo com a etiologia em cinco tipos (I-V). O tipo A-I é causado pelo vírus CSFV e caracteriza-se por hipoplasia cerebelar (DONE et al., 1984). A causa do tipo A-III é um defeito genético apresentado apenas pela raça Landrace, que ocasiona a ausência de bainha de mielina e redução do número de oligodendrócitos (BLAKEMORE; HARDING; DONE, 1974). O tipo A-IV é ocasionado por um defeito genético recessivo na raça suína Saddleback, que é caracterizado pela hipomielinogênese no cérebro e medula espinhal (PATTERSON et al., 1973). Já o tipo A-V é causado por intoxicação pelo triclorfom ou metrifonato, que pode estar associada à ingestão de alimentos tratados com este composto que é usado como inseticida ou pelo seu uso durante a gestação como uma droga antiparasitária, levando à ocorrência de hipoplasia cerebelar nos leitões (KNOX et al., 1978). Até pouco tempo a etiologia do TC tipo A-II era desconhecida. Inicialmente circovírus suíno 2 (PCV-2), foi associado a esta enfermidade, porém alguns estudos contestavam essa possibilidade (KENNEDY et al., 2003). Em 2015, ARRUDA et al. (2016) detectaram, pela primeira vez, APPV em animais com TC nos EUA. Para comprovar a associação do vírus com a doença, os autores inocularam uma amostra de soro, positiva na RT-*q*PCR, em seis matrizes aos 45 ($n=3$) e 62 ($n=3$) dias de gestação. A maioria dos leitões nascidos apresentou sinais clínicos de TC e *splay leg* (comumente conhecida como perna aberta) e a infecção por APPV foi confirmada por RT-*q*PCR. A partir de então, APPV foi considerado o agente etiológico do TC tipo A-II. O Quadro 2 resume as diferenças entre os tipos de TC.

Quadro 1 – Classificação e etiologia do tremor congênito em leitões

Classificação	Lesões histopatológicas no SNC [#]	Tipos	Etiologia
A	Sim	I	Vírus da peste suína clássica (CSFV)
		II	Pestivírus suíno atípico (APPV)
		III	Defeito genético – raça suína Landrace
		IV	Defeito genético – raça suína Saddleback
		V	Intoxicação por triclorfom
B	Não	-	Desconhecida

[#]SNC = sistema nervoso central

Fonte: próprio autor

Logo em seguida, um estudo semelhante conduzido na Alemanha também detectou APPV em amostras biológicas provenientes de animais com TC que foram usadas para inocular três matrizes aos 32 dias de gestação. Duas leitegadas apresentaram animais com TC e foram positivas no teste de RT-PCR, enquanto a terceira leitegada não apresentou sinais da doença e foi negativa para o vírus, comprovando a associação de APPV com os casos de TC (DE GROOF et al., 2016). Assim como pode ocorrer em outros pestivírus, ambos os estudos de inoculação comprovaram que APPV também pode ser transmitido pela via transplacentária.

2.1 GÊNERO *PESTIVIRUS*

O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae* e, até 2018, era composto por quatro espécies reconhecidas, denominadas pestivírus clássicos que incluem vírus da diarreia viral bovina 1 e 2 (BVDV-1 e -2), vírus da peste suína clássica (CSFV) e vírus da doença da fronteira (BDV) (SIMMONDS et al., 2011). Adicionalmente, vários pestivírus, foram propostos como novas espécies e são, portanto, denominados atípicos, como *Pronghorn antelope pestivirus* (VILCEK et al., 2005), vírus *Bungowannah* (KIRKLAND et al., 2007), *Giraffe pestivirus* (BECHER et al., 2014), vírus *HoBi* (SCHIRRMIEIER et al., 2004), vírus *Aydin-like* (POSTEL et al., 2015), *Norway rat pestivirus* (FIRTH et al., 2014) e *Rhinolophus affinis pestivirus* (WU et al., 2012). Recentemente, foram descritos dois novos pestivírus, provisoriamente denominados *atypical porcine pestivirus* (APPV) e “*lateral-shaking inducing neurodegenerative agent*” (*Linda virus* - LV) (LAMP et al., 2017).

Um grande número de novas espécies virais tem sido proposto no gênero *Pestivirus* e desde 2009 não havia qualquer alteração na taxonomia desse gênero. Com isso, Smith e

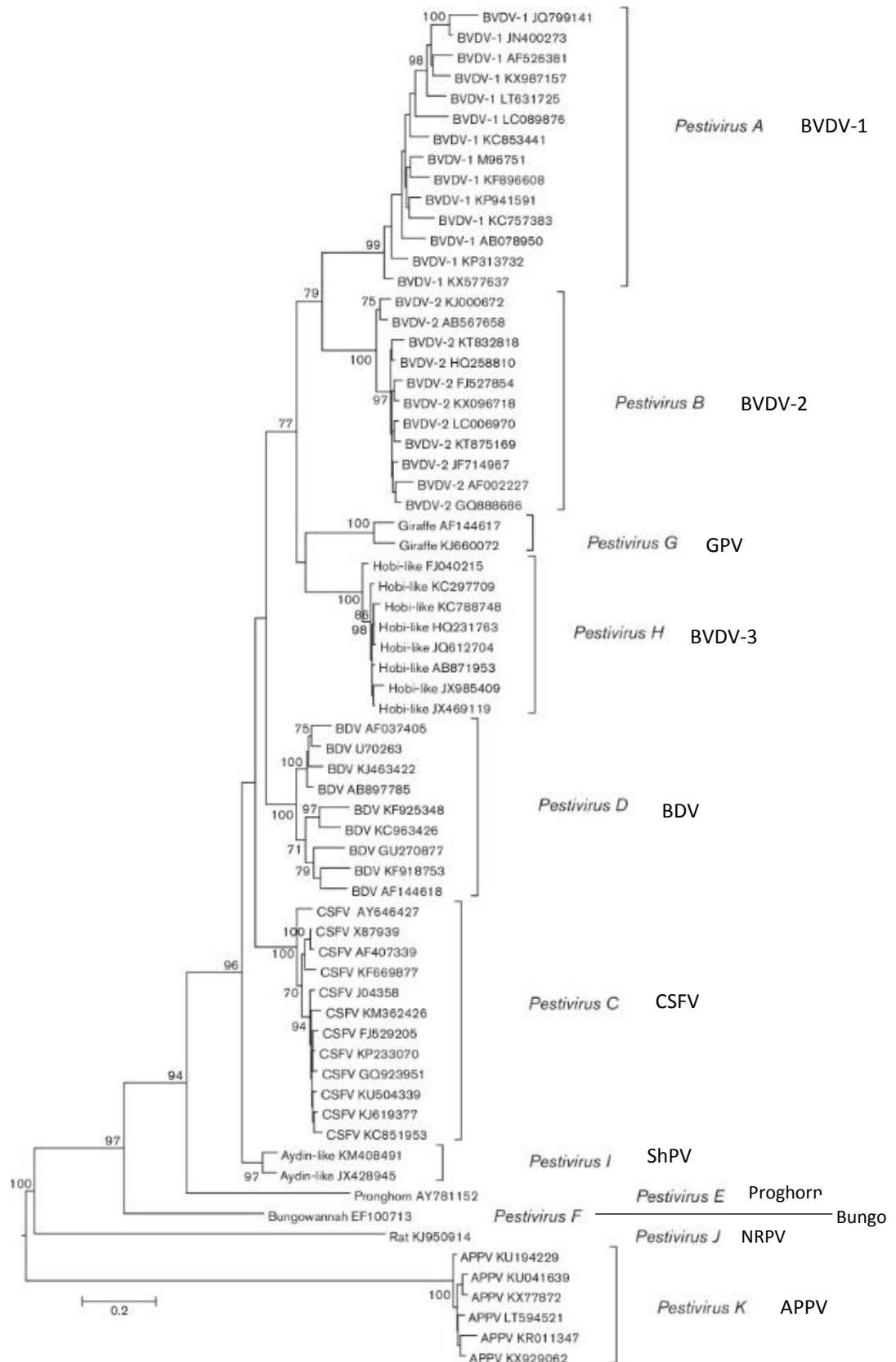
colaboradores (2017) propuseram que o grupo de estudos da família *Flaviviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) revisasse a taxonomia do gênero *Pestivirus*, de acordo com os métodos analíticos já utilizados na revisão taxonômica dos gêneros *Hepacivirus* (que contém vírus da hepatite C) e *Pegivirus* (que contém pegivírus humano) também incluídos nesta mesma família viral. Esta classificação foi aceita pelo ICTV e, atualmente, no gênero *Pestivirus* estão incluídas 11 espécies virais denominadas *Pestivirus A* – *K* (ICTV, 2018), com exceção de *Rhinolophus affinis pestivirus* e *Linda virus* que, ainda, não foram aceitos como espécies oficiais (Quadro 1). A Figura 1 demonstra a árvore filogenética das espécies que pertencem ao gênero *Pestivirus*.

Quadro 2 - Nomenclatura atual e antiga das espécies do gênero *Pestivirus* e as espécies animais suscetíveis

Atual	Antiga	Espécie animal
<i>Pestivirus A</i>	<i>Bovine viral diarrhea virus</i> -1 (BVDV-1)	Bovino, ovino, outros ruminantes, suíno
<i>Pestivirus B</i>	<i>Bovine viral diarrhea virus</i> - 2 (BVDV-2)	Bovino, ovino, outros ruminantes, suíno
<i>Pestivirus C</i>	<i>Classical swine fever virus</i> (CSFV)	Suíno
<i>Pestivirus D</i>	<i>Border disease virus</i> (BDV)	Ovino, caprino, rena, suíno
<i>Pestivirus E</i>	<i>Pronghorn antelope pestivirus</i>	Antilocapra
<i>Pestivirus F</i>	<i>Bungowannah virus</i>	Suíno
<i>Pestivirus G</i>	<i>Giraffe pestivirus</i>	Girafa, bovino
<i>Pestivirus H</i>	<i>Hobi-like pestivirus</i> (ou BVDV-3)	Bovino, búfalo
<i>Pestivirus I</i>	<i>Aydin-like pestivirus</i>	Ovino, caprino
<i>Pestivirus J</i>	<i>Norway rat pestivirus</i>	Rato
<i>Pestivirus K</i>	<i>Atypical porcine pestivirus</i> (APPV)	Suíno
Não classificado	<i>Linda virus</i>	Suíno
Não classificado	<i>Rhinolophus affinis pestivirus</i>	Morcego

Fonte: Smith et al. (2017) - adaptado

Figura 1 - Árvore filogenética do gênero *Pestivirus* com a nova nomenclatura das espécies, construída com base na sequência de aminoácidos de um fragmento da poliproteína

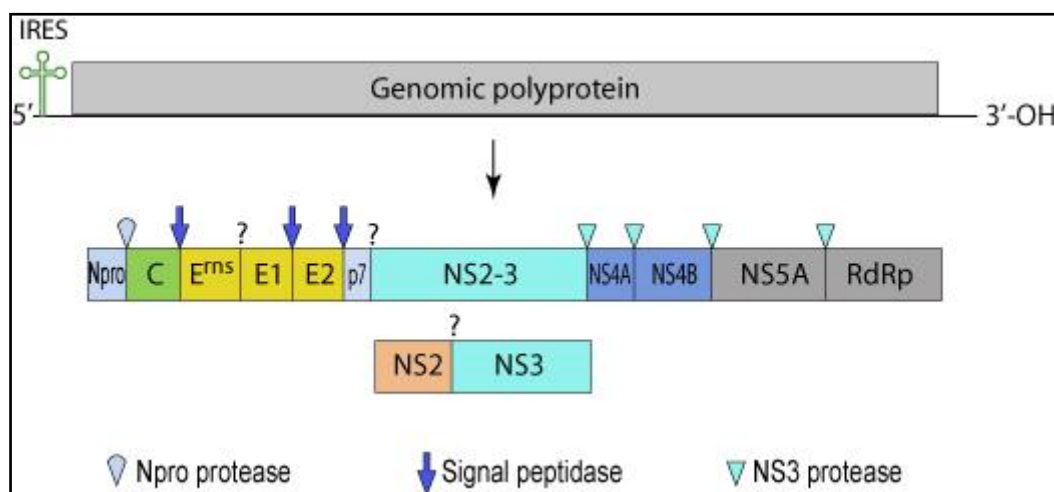


Fonte: Smith et al. (2017)

APPV = *atypical porcine pestivirus*; BDV = *border disease virus*; Bungo = *Bungowannah virus*; BVDV = *bovine viral diarrhea virus*; CSFV = *classical swine fever virus*; GPV = *giraffe pestivirus*; NRPV = *Norway rat pestivirus*; Pronghorn = *Pronghorn antelope pestivirus*; ShPV = *sheep pestivirus*

Os pestivírus tem um tamanho aproximado de 50 nm, são envelopados e possuem genoma constituído por RNA fita simples polaridade positiva que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (aa), flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR - *untranslated region*). A poliproteína é clivada em quatro proteínas estruturais (C, E^{ms}, E1, E2) e oito não estruturais (Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Figura 2) (TAUTZ; TEWS; MEYERS, 2015).

Figura 2 - Esquema demonstrando a organização do genoma de representantes do gênero *Pestivirus*



Fonte: https://viralzone.expasy.org/39?outline=all_by_species

A infecção por pestivírus clássicos foi associada a manifestações clínicas neurológicas e lesões no SNC de diferentes espécies hospedeiras. BVDV acomete principalmente bovinos, mas pode infectar outros ruminantes e também suínos. Dentre as afecções mais comuns decorrentes da infecção por BVDV em bovinos estão as malformações congênitas no SNC, como hipoplasia cerebelar, hidranencefalia, porencefalia, hidrocefalia e microencefalia (AGERHOLM et al., 2015). Casos de tremor e ataxia já foram descritos em bezerros infectados por BVDV (RIOND et al., 1990; PORTER et al., 2010). Em relação às lesões histopatológicas, a infecção por BVDV em bovinos pode causar degeneração neuronal, necrose, gliose e edema e, em alguns casos, hipomielinização do SNC (RIOND et al., 1990; BLANCHARD et al., 2010; PORTER et al., 2010). Em cabritos recém-nascidos BVDV já foi

descrito causando tremor e ataxia (BACHOFEN et al., 2013). BDV causa doença congênita em ovinos e caprinos, sendo que o tremor é o sinal clínico característico desta enfermidade (NETTLETON et al., 1998; GARCIA-PEREZ et al., 2009). CSFV está frequentemente associado a sinais clínicos neurológicos como incoordenação, convulsão e desequilíbrio com fraqueza em membros posteriores em animais de diferentes faixas etárias e pode, ainda, ocasionar TC em leitões infectados pela via transplacentária (MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003). Em infecções tanto por BDV quanto por CSFV os achados histopatológicos mais comuns são hipomielinização e gliose (BARLOW; STOREY, 1977; BRADLEY et al., 1983; MOLLER et al., 1993). Adicionalmente, sinais neurológicos como tremores musculares e incoordenação motora foram descritos em cordeiros com infecção por pestivírus; entretanto, não foi possível diagnosticar a espécie viral envolvida (PESCADOR et al., 2004).

2.2 PESTIVÍRUS SUÍNO ATÍPICO

O genoma de APPV tem aproximadamente 11 kb e contém uma longa fase aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) que codifica uma poliproteína com 3.635 aa, ou seja, em torno de 250 aa a menos que os demais pestivírus (HAUSE et al., 2015). Esta poliproteína é clivada em quatro proteínas estruturais e oito não estruturais, como os demais pestivírus. A região 5'-UTR do genoma de APPV possui 360-370 nt, um pouco menor que os demais pestivírus e a região 3'-UTR tem 245-268 nt, consistente com os demais pestivírus (HAUSE et al., 2015; SCHWARZ et al., 2017). Análises do genoma completo de APPV têm demonstrado que este vírus apresenta menos de 50% de identidade de nucleotídeo (nt) com os pestivírus clássicos (SCHWARZ et al., 2017). De acordo com as sequências genômicas de APPV disponíveis, Yuan e colaboradores (2017) realizaram a análise do ancestral comum mais recente por inferência Bayesiana, o que demonstrou que provavelmente APPV surgiu na Alemanha e se propagou para as Américas, China e outros países da Europa.

A proteína E2, é uma glicoproteína de envelope imunodominante que possui epitopos de neutralização e, portanto, é a proteína dos pestivírus que apresenta maior diversidade (RIDPATH; BOLIN, 1997). Nas análises moleculares realizadas por Hause e colaboradores (2015) a proteína E2 de APPV apresentou tamanho menor do que a mesma proteína dos demais pestivírus, com isso os autores sugeriram que a redução substancial no tamanho da E2 e apenas 30% de identidade com as proteínas E2 dos demais pestivírus poderiam resultar em

uma mudança na utilização do receptor celular, o que pode explicar a dificuldade de isolamento de APPV.

2.2.1 Diagnóstico

Cultivo celular

O isolamento viral em cultivo celular é considerado o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de infecções virais. Três estudos realizaram tentativas de isolamento de APPV. Foram utilizadas, principalmente, células suscetíveis para outros pestivírus, como células renais suínas (PK-15 e SK-6) e células epiteliais de testículo suíno (STE) (HAUSE et al., 2015; POSTEL et al., 2016; SCHWARZ et al., 2017), além de células renais de macaco (MARC-145), células epiteliais renais de macaco verde africano (Vero e Vero 76), células de adenocarcinoma humano (HCT-8), células renais bovinas (MDBK), células renais caninas (MDCK) (HAUSE et al., 2015), células de linfoma suíno (38A1D) e células endoteliais suínas (PEDSV.15) (POSTEL et al., 2016), entretanto, todas sem sucesso. Beer e colaboradores (2016) utilizando uma amostra de soro positiva para APPV inoculada em uma linhagem celular de rim suíno (SPEV) foram os primeiros a obter sucesso no isolamento do vírus. O isolamento foi confirmado por RT-*q*PCR e NGS.

Sorologia

Até o momento, existem três ensaios de ELISA padronizados para APPV. Em um deles, peptídeos recombinantes da proteína E^{ms} do vírus foram expressos em *E. coli*. Entretanto, este teste não foi validado com soros suínos sabidamente positivos e negativos para APPV (HAUSE et al., 2015). Outro ELISA indireto padronizado com a proteína E^{ms} recombinante expressa em *Leishmania tarentolae* foi utilizado para avaliar 189 amostras de soros suínos da Itália e Alemanha, resultando em 118 (62%) amostras reagentes (POSTEL et al., 2017b). O terceiro ELISA desenvolvido é um teste de bloqueio que utilizou o domínio helicase da proteína NS3. Neste estudo, 170 amostras de soro de um rebanho suíno sabidamente positivo por RT-PCR foram avaliadas e 35,3% das amostras foram positivas, sendo que matrizes com histórico de leitegadas com TC apresentaram atividade de bloqueio maior que a média de matrizes sem histórico (SCHWARZ et al., 2017).

Biologia molecular

Atualmente, as principais técnicas empregadas no diagnóstico da infecção por APPV são a RT-PCR, RT-*q*PCR e NGS (HAUSE et al., 2015; ARRUDA et al., 2016; BEER et al., 2016; YUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Com o uso destas metodologias já foram disponibilizadas 19 sequências completas do genoma do vírus (HAUSE et al., 2015; ARRUDA et al., 2016; ZHANG et al., 2017). A maioria dos protocolos padronizados utilizam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificam as regiões NS3 e NS5 do genoma viral (ARRUDA et al., 2016; BEER et al., 2016; POSTEL et al., 2016; SCHWARZ et al., 2017; YUAN et al., 2017; POSSATTI et al., 2018b). Também já foram descritos *primers* para as regiões E2, E^{ms}, NS4B e para a região conservada 5' - UTR (HAUSE et al., 2015; DE GROOF et al., 2016; POSTEL et al., 2016). Adicionalmente, Zhang e colaboradores (2017) descreveram vários conjuntos de *primers* que possibilitaram o sequenciamento do genoma que codifica a poliproteína completa de APPV.

Exames histopatológicos

Não há relatos de lesão macroscópica significativa encontrada durante as autópsias de animais com TC. Os achados histopatológicos em infecções por APPV incluem principalmente vacuolização da substância branca do cerebelo e tronco cerebral (MÓSENA et al., 2018). Estudos utilizando o método *Luxol Fast Blue* demonstraram redução na intensidade da coloração da mielina na substância branca da medula espinhal e/ou nervo ciático (POSTEL et al., 2016; SCHWARZ et al., 2017; MÓSENA et al., 2018). Em um estudo que utilizou imuno-histoquímica para coloração de oligodendrócitos, os animais com TC apresentaram aumento na intensidade da coloração em relação aos animais do grupo controle (SCHWARZ et al., 2017). O mesmo estudo realizou microscopia eletrônica em fragmentos do cerebelo e medula oblonga de dois leitões com TC e identificou alterações ultra-estruturais na mielina (hipomielinização, rompimento, vacúolos), vacúolos nas membranas e espaços no citoplasma de células da glia e degeneração de axônios (SCHWARZ et al., 2017).

2.2.2 Epidemiologia

Após os estudos de inoculação experimental, outros autores relataram a presença do genoma de APPV em amostras clínicas provenientes de animais com TC em diferentes países.

Em um estudo conduzido na Alemanha, APPV foi detectado no soro e SNC de seis leitões com dois dias de idade (POSTEL et al., 2016). Na Holanda e Espanha, APPV foi detectado em granjas suínas com surtos de TC e os autores propuseram a classificação genética das cepas identificadas em três tipos, denominados A, B e C, de acordo com a análise filogenética dos genes completos E2 e Npro (DE GROOF et al., 2016). Em 2016, outro estudo na Espanha também detectou APPV em amostras de 11 leitões de dois dias de idade (MUÑOZ-GONZALEZ et al., 2017). O primeiro relato de APPV em leitões com sinais clínicos de TC na China foi realizado em 2016 (ZHANG et al., 2017). A análise filogenética da poliproteína completa demonstrou que as duas cepas chinesas identificadas no estudo agruparam em um ramo independente das cepas detectadas nos EUA e Europa. Um outro estudo conduzido em outra região da China corroborou estes resultados, demonstrando que novas cepas identificadas em amostras biológicas de leitões com TC formaram um grupo distinto, sendo classificadas como tipo D (ZHANG et al., 2018), de acordo com a divisão proposta anteriormente (DE GROOF et al., 2016). Três estudos adicionais realizados na China também detectaram APPV em leitões com TC (YUAN et al., 2017; PAN et al., 2018; WU et al., 2018). No Canadá, o primeiro relato de APPV associado a casos de TC ocorreu em 2018 em leitões nascidos de cinco das 20 mães introduzidas na granja (DESSUREAULT et al., 2018).

Muito antes da sua primeira descrição em 2015, estudos retrospectivos demonstram a circulação de APPV em rebanhos suínos europeus. Um dos estudos, conduzido na Alemanha, analisou amostras biológicas colhidas no ano de 2007 e detectou APPV em cerebelo de animais com TC, cuja etiologia era desconhecida (POSTEL et al., 2016). Outro estudo, realizado na Espanha, detectou APPV em amostras de soro colhidas entre os anos de 1997 e 2016 (MUÑOZ-GONZALEZ et al., 2017). APPV também foi detectado em amostras de leitões com TC em granjas da Áustria nos anos de 2013 a 2016 (SCHWARZ et al., 2017). Em um estudo na Hungria foi detectado APPV em amostras de SNC de 25 leitões com TC de seis diferentes granjas de 2005 até 2018 (DÉNES et al., 2018).

Alguns estudos investigaram a presença de APPV em amostras provenientes de animais sem sinais clínicos de TC e demonstraram alta prevalência do vírus. Na Alemanha utilizando RT-*q*PCR foram encontradas prevalências de 9% ($n = 33$) em amostras de tonsilas coletadas de 367 animais durante o abate e de 22% ($n = 14$) em amostras de soro de animais de terminação e reprodutores, adicionalmente, todas as 12 amostras de tonsilas coletadas durante o abate de suínos provenientes de uma granja orgânica foram positivas para APPV (BEER et al., 2016). Outro estudo realizado na Alemanha avaliou 369 soros de matrizes e

suínos de terminação de 29 granjas e demonstrou prevalência de 2,4% ($n = 9$) nos suínos e 10% ($n = 3$) nas granjas (POSTEL et al., 2016). Na China, 135 soros foram coletados de forma aleatória de matrizes e suínos de terminação de 10 propriedades, avaliados por RT-PCR e apresentaram prevalência de 5,2% ($n = 7$) (YUAN et al., 2017). Outro estudo avaliou, por RT-PCR, 1460 amostras de soro de suínos assintomáticos provenientes da Alemanha, Itália, Sérvia, Grã-Bretanha, Suíça, China e Taiwan e encontrou uma prevalência de 8,9% ($n = 130$) de amostras positivas para APPV, sendo que a maior prevalência foi na Itália com 17,5% (35/200) (POSTEL et al., 2017a).

APPV já foi detectado em amostras de sêmen e líquido prepucial de reprodutores suínos criados nos EUA. As amostras clínicas avaliadas faziam parte do acervo do Laboratório de Diagnóstico Veterinário da Universidade do Estado de Iowa que haviam sido submetidas a outros exames de rotina. Das 597 amostras avaliadas, 90 (15,1%) foram positivas para APPV (ARRUDA et al., 2016). Anteriormente, APPV já havia sido detectado em amostra de sêmen e de suabe prepucial, ambos obtidos de dois machos adultos que haviam apresentado TC ao nascimento (DE GROOF et al., 2016; SCHWARZ et al., 2017). Estes resultados sugerem que o sêmen pode ter um papel importante na transmissão do vírus, porém ainda são necessários estudos adicionais para confirmação.

Além de suínos, APPV também já foi investigado na Espanha em amostras de soro de 437 javalis jovens e adultos sem sinais clínicos de TC utilizando RT-*q*PCR e uma amostra de um macho adulto foi positiva. Na análise filogenética a cepa identificada agrupou com outra cepa previamente descrita na Espanha (COLOM-CADENA et al., 2018). Já na Alemanha, foi encontrada prevalência de 19% (87/456), também em amostras de soros de javalis avaliadas por RT-PCR (CAGATAY et al., 2018).

Em 2018, APPV foi descrito no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. O estudo avaliou duas granjas produtoras de leitões que apresentavam casos esporádicos de TC em leitegadas de primíparas. Foram avaliadas amostras de sangue de leitões com 10 dias de idade e amostras de tecido de um animal, todos acometidos por TC. As amostras foram positivas na RT-PCR e os achados histopatológicos descritos foram vacuolização da substância branca do cerebelo e tronco encefálico e desmielinização foi comprovada por *Luxol Fast Blue* (MÓSENA et al., 2018).

Outro estudo realizado no Brasil em 2018, detectou o genoma de APPV em amostras biológicas coletadas de leitões de três granjas da região Sul e de uma granja da região Sudeste cujas prevalências de sinais clínicos nas leitegadas afetadas variou de 16 a 100% de TC e 6 a 55% de *splay leg* (GATTO et al., 2018).

Simultaneamente à descrição de APPV nos dois estudos relatados, também em 2018, o nosso grupo de pesquisa identificou o genoma de APPV em amostras de SNC de leitões que apresentaram TC logo após o nascimento e vieram a óbito com três dias de idade no estado do Paraná. Neste estudo também foi detectada infecção mista por teschovírus suíno (PTV). Os exames histopatológicos demonstraram desmielinização no SNC dos animais avaliados (POSSATTI et al., 2018b). Em um estudo posterior, o nosso grupo apresentou outro relato da infecção por APPV em casos clínicos de TC ocorridos em leitões recém-nascidos de uma granja também localizada no estado do Paraná, como aspecto diferencial, por se tratar de infecção singular por APPV, puderam ser descritas as principais alterações histopatológicas decorrentes da infecção (POSSATTI et al., 2018a).

3 REFERÊNCIAS

AGERHOLM, J.S.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; PEPERKAMP, K.; WINDSOR, P.A. Virus-induced congenital malformations in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, p. 54, 2015.

ARRUDA, B.L.; ARRUDA, P.H.; MAGSTADT, D.R.; SCHWARTZ, K.J.; DOHLMAN, T.; SCHLEINING, J.A.; PATTERSON, A.R.; VISEK, C.A.; VICTORIA, J.G. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0150104, 2016.

BACHOFEN, C.; VOGT, H.R.; STALDER, H.; MATHYS, T.; ZANONI, R.; HILBE, M.; SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. **Veterinary Research**, v. 44, p. 32, 2013.

BARLOW, R.M.; STOREY, I.J. MYELINATION OF THE OVINE CNS WITH SPECIAL REFERENCE TO BORDER DISEASE. I. QUALITATIVE ASPECTS. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 3, n. 4, p. 237-253, 1977.

BECHER, P.; FISCHER, N.; GRUNDHOFF, A.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M.; POSTEL, A. Complete genome sequence of bovine pestivirus strain PG-2, a second member of the tentative pestivirus species Giraffe. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, 2014.

BEER, M.; WERNIKE, K.; DRAGER, C.; HOPER, D.; POHLMANN, A.; BERGERMANN, C.; SCHRODER, C.; KLINKHAMMER, S.; BLOME, S.; HOFFMANN, B. High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 22-26, 2016.

BLAKEMORE, W.F.; HARDING, J.D.; DONE, J.T. Ultrastructural observations on the spinal cord of a Landrace pig with congenital tremor type AIII. **Research in Veterinary Science**, v. 17, n. 2, p. 174-178, 1974.

BLANCHARD, P.C.; RIDPATH, J.F.; WALKER, J.B.; HIETALA, S.K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 1, p. 128-131, 2010.

BRADLEY, R.; DONE, J.T.; HEBERT, C.N.; OVERBY, E.; ASKAA, J.; BASSE, A.; BLOCH, B. Congenital tremor type AI: light and electron microscopical observations on the spinal cords of affected piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93, n. 1, p. 43-59, 1983.

CAGATAY, G.N.; ANTOS, A.; MEYER, D.; MAISTRELLI, C.; KEULING, O.; BECHER, P.; POSTEL, A. Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 4, p. 1087-1093, 2018.

COLOM-CADENA, A.; GANGES, L.; MUNOZ-GONZALEZ, S.; CASTILLO-CONTRERAS, R.; BOHORQUEZ, J.A.; ROSELL, R.; SEGALES, J.; MARCO, I.; CABEZON, O. Atypical porcine pestivirus in wild boar (*Sus scrofa*), Spain. **Veterinary Record**, v. 183, n. 18, p. 569, 2018.

DE GROOF, A.; DEIJS, M.; GUELEN, L.; VAN GRINSVEN, L.; VAN OS-GALDOS, L.; VOGELS, W.; DERKS, C.; CRUIJSEN, T.; GEURTS, V.; VRIJENHOEK, M.; SUIJSKENS, J.; VAN DOORN, P.; VAN LEENGOED, L.; SCHRIER, C.; VAN DER HOEK, L. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. **Viruses**, v. 8, n. 10, 2016.

DÉNES, L.; BIKSI, I.; ALBERT, M.; SZEREDI, L.; KNAPP, D.G.; SZILASI, A.; BÁLINT, Á.; BALKA, G. Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 2039-2042, 2018.

DESSUREAULT, F.G.; CHOINIERE, M.; PROVOST, C.; GAGNON, C.A. First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 4, p. 429-432, 2018.

DONE, J.T.; WOOLLEY, J.; UPCOTT, D.H.; HEBERT, C.N. Porcine congenital tremor type AI: spinal cord morphometry. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A.**, v. 31, n. 2, p. 81-90, 1984.

FIRTH, C.; BHAT, M.; FIRTH, M.A.; WILLIAMS, S.H.; FRYE, M.J.; SIMMONDS, P.; CONTE, J.M.; NG, J.; GARCIA, J.; BHUVA, N.P.; LEE, B.; CHE, X.; QUAN, P.L.; LIPKIN, W.I. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. **MBio**, v. 5, n. 5, p. e01933-01914, 2014.

GARCIA-PEREZ, A.L.; MINGUIJON, E.; ESTEVEZ, L.; BARANDIKA, J.F.; ADURIZ, G.; JUSTE, R.A.; HURTADO, A. Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 345-352, 2009.

GATTO, I.R.H.; HARMON, K.; BRADNER, L.; SILVA, P.; LINHARES, D.C.L.; ARRUDA, P.H.; DE OLIVEIRA, L.G.; ARRUDA, B.L. Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 375-380, 2018.

HAUSE, B.M.; COLLIN, E.A.; PEDDIREDDI, L.; YUAN, F.; CHEN, Z.; HESSE, R.A.; GAUGER, P.C.; CLEMENT, T.; FANG, Y.; ANDERSON, G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **The Journal of General Virology**, v. 96, n. 10, p. 2994-2998, 2015.

KENNEDY, S.; SEGALES, J.; ROVIRA, A.; SCHOLE, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 151-156, 2003.

KIRKLAND, P.D.; FROST, M.J.; FINLAISON, D.S.; KING, K.R.; RIDPATH, J.F.; GU, X. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v. 129, n. 1, p. 26-34, 2007.

KNOX, B.; ASKAA, J.; BASSE, A.; BITSCH, V.; ESKILDSEN, M.; MANDRUP, M.; OTTOSEN, H.E.; OVERBY, E.; PEDERSEN, K.B.; RASMUSSEN, F. Congenital ataxia and tremor with cerebellar hypoplasia in piglets borne by sows treated with Neguvon vet. (metrifonate, trichlorfon) during pregnancy. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 30, n. 12, p. 538-545, 1978.

LAMP, B.; SCHWARZ, L.; HOGLER, S.; RIEDEL, C.; SINN, L.; REBEL-BAUDER, B.; WEISSENBOCK, H.; LADINIG, A.; RUMENAPF, T. Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 7, p. 1176-1179, 2017.

MOENNIG, V.; FLOEGEL-NIESMANN, G.; GREISER-WILKE, I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. **Veterinary Journal**, v. 165, n. 1, p. 11-20, 2003.

MOLLER, J.R.; MCLENIGAN, M.; POTTS, B.J.; QUARLES, R.H. Effects of congenital infection of sheep with border disease virus on myelin proteins. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1808-1812, 1993.

MÓSENA, A.C.S.; WEBER, M.N.; DA CRUZ, R.A.S.; CIBULSKI, S.P.; DA SILVA, M.S.; PUHL, D.E.; HAMMERSCHMITT, M.E.; TAKEUTI, K.L.; DRIEMEIER, D.; DE BARCELLOS, D.; CANAL, C.W. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 1, p. 22-26, 2018.

MUÑOZ-GONZALEZ, S.; CANTURRI, A.; PEREZ-SIMO, M.; BOHORQUEZ, J.A.; ROSELL, R.; CABEZON, O.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; GANGES, L. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 1645-1649, 2017.

NETTLETON, P.F.; GILRAY, J.A.; RUSSO, P.; DLISSI, E. Border disease of sheep and goats. **Veterinary Research**, v. 29, n. 3-4, p. 327-340, 1998.

PAN, S.; YAN, Y.; SHI, K.; WANG, M.; MOU, C.; CHEN, Z. Molecular characterization of two novel atypical porcine pestivirus (APPV) strains from piglets with congenital tremor in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 10.1111/tbed.13029. 2018.

PATTERSON, D.S.; SWEASEY, D.; BRUSH, P.J.; HARDING, J.D. Neurochemistry of the spinal cord in British Saddleback piglets affected with congenital tremor, type A-IV, a second form of hereditary cerebrosplinal hypomyelinogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 21, n. 2, p. 397-406, 1973.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; GONÇALVES, R.K.; CRUZ, C.E.F. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 935-938, 2004.

PORTER, B.F.; RIDPATH, J.F.; CALISE, D.V.; PAYNE, H.R.; JANKE, J.J.; BAXTER, D.G.; EDWARDS, J.F. Hypomyelination associated with bovine viral diarrhea virus type 2 infection in a longhorn calf. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 4, p. 658-663, 2010.

POSSATTI, F.; DE OLIVEIRA, T.E.S.; LEME, R.A.; ZOTTI, E.; DALL AGNOL, A.M.; ALFIERI, A.F.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A. Pathologic and molecular findings associated with atypical porcine pestivirus infection in newborn piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 227, p. 41-44, 2018a.

POSSATTI, F.; HEADLEY, S.A.; LEME, R.A.; DALL AGNOL, A.M.; ZOTTI, E.; DE OLIVEIRA, T.E.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 331-337, 2018b.

POSTEL, A.; SCHMEISER, S.; OGUZOGLU, T.C.; INDENBIRKEN, D.; ALAWI, M.; FISCHER, N.; GRUNDHOFF, A.; BECHER, P. Close relationship of ruminant pestiviruses and classical Swine Fever virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 4, p. 668-672, 2015.

POSTEL, A.; HANSMANN, F.; BAECHLEIN, C.; FISCHER, N.; ALAWI, M.; GRUNDHOFF, A.; DERKING, S.; TENHUNDFELD, J.; PFANKUCHE, V.M.; HERDER, V.; BAUMGARTNER, W.; WENDT, M.; BECHER, P. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27735, 2016.

POSTEL, A.; MEYER, D.; CAGATAY, G.N.; FELIZIANI, F.; DE MIA, G.M.; FISCHER, N.; GRUNDHOFF, A.; MILICEVIC, V.; DENG, M.C.; CHANG, C.Y.; QIU, H.J.; SUN, Y.; WENDT, M.; BECHER, P. High Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 12, p. 2104-2107, 2017a.

POSTEL, A.; MEYER, D.; PETROV, A.; BECHER, P. Recent emergence of a novel porcine pestivirus: interference with classical swine fever diagnosis? **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 4, p. e19, 2017b.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. **Virus Research**, v. 50, n. 2, p. 237-243, 1997.

RIOND, J.L.; CULLEN, J.M.; GODFREY, V.L.; HUNT, E.L.; ANDERSON, K.L. Bovine viral diarrhea virus-induced cerebellar disease in a calf. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 12, p. 1631-1632, 1990.

SCHIRRMEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 12, p. 3647-3652, 2004.

SCHWARZ, L.; RIEDEL, C.; HOGLER, S.; SINN, L.J.; VOGLMAYR, T.; WOCHTL, B.; DINHOPL, N.; REBEL-BAUDER, B.; WEISSENBOCK, H.; LADINIG, A.; RUMENAPF, T.; LAMP, B. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1, 2017.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; COLLET, M.S.; GOULD, E.A.; HEINZ, F.X.; MEYERS, G.; MONATH, T.; PLETNEV, A.; RICE, C.M. Family Flaviviridae, In: KING, A. M. Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; FAUQUET, C. M. (org). **Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2011. p. 1003-1020.

SMITH, D.B.; MEYERS, G.; BUKH, J.; GOULD, E.A.; MONATH, T.; SCOTT MUEHROFF, A.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; STAPLETON, J.T.; SIMMONDS, P.; BECHER, P. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **The Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 2106-2112, 2017.

TAUTZ, N.; TEWS, B.A.; MEYERS, G. The Molecular Biology of Pestiviruses, In: ROOSSINCK, M.; PALUKAITIS, P. (org). **Advances in Virus Research**. Cambridge: Academic Press, 2015. p. 47-160.

VILCEK, S.; RIDPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 187-193, 2005.

WU, S.; WANG, Z.; ZHANG, W.; DENG, S. Complete Genome Sequence of an Atypical Porcine Pestivirus Isolated from Jiangxi Province, China. **Genome Announcements**, v. 6, n. 24, 2018.

WU, Z.; REN, X.; YANG, L.; HU, Y.; YANG, J.; HE, G.; ZHANG, J.; DONG, J.; SUN, L.; DU, J.; LIU, L.; XUE, Y.; WANG, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. **Journal of Virology**, v. 86, n. 20, p. 10999-11012, 2012.

YUAN, J.; HAN, Z.; LI, J.; HUANG, Y.; YANG, J.; DING, H.; ZHANG, J.; ZHU, M.; ZHANG, Y.; LIAO, J.; ZHAO, M.; CHEN, J. Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 862, 2017.

ZHANG, H.; WEN, W.; HAO, G.; HU, Y.; CHEN, H.; QIAN, P.; LI, X. Phylogenetic and genomic characterization of a novel atypical porcine pestivirus in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 1, p. e202-e204, 2018.

ZHANG, K.; WU, K.; LIU, J.; GE, S.; XIAO, Y.; SHANG, Y.; NING, Z. Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 4, p. 1020-1023, 2017.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar pestivírus suíno atípico e caracterizar as lesões histopatológicas mais frequentes em amostras biológicas provenientes de leitões recém-nascidos com tremor congênito.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar uma reação de *nested*-RT-PCR para o diagnóstico de pestivírus suíno atípico.
- Detectar RNA de pestivírus suíno atípico em amostras biológicas de leitões com tremor congênito.
- Avaliar coinfeções com teschovírus suíno, sapelovírus suíno e vírus *Seneca Valley* nas amostras analisadas.
- Comparar e descrever os achados histopatológicos observados em leitões com tremor congênito e infectados com pestivírus suíno atípico com os de leitões clinicamente saudáveis.
- Caracterizar a gliose utilizando a técnica de imunohistoquímica para marcação da
- Avaliar o grau de desmielinização no sistema nervoso central pela coloração de *Luxol Fast Blue*.

5 ARTIGO 1

VIRUSES ASSOCIATED WITH CONGENITAL TREMOR AND HIGH LETHALITY IN PIGLETS (doi: 10.1111/tbed.12807)

Received: 24 October 2017

DOI: 10.1111/tbed.12807

RAPID COMMUNICATION

WILEY  Transboundary and Emerging Diseases

Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets

F. Possatti¹ | S. A. Headley^{2,3}  | R. A. Leme^{1,4}  | A. M. Dall Agnol¹ | E. Zotti⁵ | T. E. S. de Oliveira² | A. F. Alfieri^{1,4}  | A. A. Alfieri^{1,4} 

¹Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

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

³Multi-User Animal Health Laboratory, Tissue Processing Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁴Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁵Department of Veterinary Medicine, Pontifícia Universidade Católica, Toledo, Paraná, Brazil

Correspondence

A. A. Alfieri, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Londrina, PR, Brazil. Email: alfieri@uel.br

Funding information

National Council of Scientific and Technological Development (CNPq); the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES); Financing of Studies and Projects (FINEP); the Araucária Foundation (FAP/PR)

Summary

The recently described atypical porcine pestivirus (APPV) has been associated with congenital tremor (CT) type A-II in piglets in different countries. Another important neurological pathogen of pigs is porcine teschovirus (PTV), which has been associated with non-suppurative encephalomyelitis in pigs with severe or mild neurological disorders. There have been no reports of APPV and/or PTV coinfection associated with CT or encephalomyelitis in Brazilian pig herds. The aim of this study was to describe the pathological and molecular findings associated with simultaneous infection of APPV and PTV in piglets with clinical manifestations of CT that were derived from a herd with high rates of CT-associated lethality. In 2017, three piglets from the same litter with CT died spontaneously. The principal pathological alterations in all piglets were secondary demyelination and hypomyelination at the cerebellum, brainstem and spinal cord confirmed by histopathology and luxol fast blue–cresyl violet stain. Additional significant pathological findings included multifocal neuronal necrosis, neuronophagia and gliosis found in the cerebral cortex and spinal cord of all piglets, while atrophic enteritis and mesocolonic oedema were observed in some of them. APPV and PTV RNA were detected in the central nervous system of affected piglets, and PTV was also detected in the intestine and faeces. The pathological alterations and molecular findings together suggest a dual infection due to APPV and PTV at this farm. Moreover, the combined effects of these pathogens can be attributed to the elevated piglet mortality, as coinfections involving PTV have a synergistic effect on the affected animals.

KEYWORDS

atypical porcine pestivirus, myoclonia, neurological infection, piglets, porcine teschovirus

1 | INTRODUCTION

Congenital tremor (CT) is a neurological manifestation of repetitive myoclonus (Done, 1968). The clinical signs may vary in intensity, with severe cases resulting in death of the affected piglets due to starvation or insufficient colostrum intake. Based on the presence or absence of histopathological alterations in the central nervous system (CNS), CT is classified as types A and B, respectively (Done,

1968). Additionally, CT type A is subdivided into A-I to A-V, according to the aetiology of the disease. The classical swine fever virus has been associated with the type A-I manifestation (Bradley et al., 1983); types A-III and A-IV have been associated with genetic origin (Blakemore, Harding, & Done, 1974; Patterson, Sweasey, Brush, & Harding, 1973); and type A-V has been associated with toxicosis due to trichlorfon (Knox et al., 1978). However, the aetiology associated with the type A-II cases was not defined until 2016, when Arruda

et al. (2016) described newborn piglets presenting CT after pregnant sows were inoculated with a novel pestivirus, tentatively named as atypical porcine pestivirus (APPV).

APPV was suggested as a new species within the *Pestivirus* genus that is composed of four recognized species: bovine viral diarrhoea virus 1 (BVDV-1), bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV-2), classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV) (ICTV, 2016). APPV was first described in 2015, after being identified in porcine serum samples, using next-generation sequencing (NGS), but without any association with clinical signs (Hause et al., 2015). Thereafter, APPV infection with associated clinical manifestations was identified in piglets from Germany (Postel et al., 2016), Austria (Schwarz et al., 2017), China (Yuan et al., 2017; Zhang et al., 2017), Spain, the Netherlands (de Groof et al., 2016) and Brazil (Mósená et al., 2017). However, in all reports thus far, coinfections with other viral pathogens were not reported.

Porcine teschovirus (PTV) is a small, non-enveloped, single-stranded RNA virus that belongs to the species *Teschovirus A*, genus *Teschovirus* within the *Picornaviridae* family (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2016). PTV is a ubiquitous virus that can be detected in both asymptomatic and symptomatic pigs at different ages (Cano-Gomez et al., 2011). Occasionally, depending on the serotype involved in the infection, PTV clinical manifestations may include enteric, reproductive and respiratory illness. PTV has also been associated with non-suppurative encephalomyelitis in pigs with severe or mild neurological disorders (Yamada et al., 2014).

Porcine teschovirus-associated encephalomyelitis in pigs was first recorded approximately 88 years ago in the Czech city of Teschen. Subsequently, the Teschen disease spread throughout Europe and other continents, leading to important economic losses to the swine industry (Cano-Gomez et al., 2011; Yamada et al., 2014). Less severe forms of the disease were later recognized in Talfan, Wales and Denmark and were named Talfan disease, poliomyelitis suum or benign enzootic paresis (OIE, 2008). Although the PTV-induced encephalomyelitis is classically caused by strains of PTV serotype 1, other pathogenic PTV strains were also subsequently defined as causative agents of encephalomyelitis (Yamada et al., 2014).

A previous study showed that enteric PTV has been circulating in pig herds in distinct geographical regions of Brazil (Donin, Leme, Alfieri, Alberton, & Alfieri, 2014); however, there are no reports of neurological disease associated with PTV infection in pigs of this country.

The aim of this study was to describe the pathological and molecular findings associated with the simultaneous infection of APPV and PTV in piglets with clinical manifestations of CT derived from a herd with high rates of CT-associated lethality.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethical approval

The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and approved under

the identification number 11363.2015.16. All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

2.2 | Animals and study location

The piglets included in this study were derived from a pig farm located in the western region of Paraná state that holds approximately 550 sows. In 2015, newborn piglets manifested neurological signs compatible with CT soon after birth. Since then, this farm experienced occasional cases of muscle tremor in newborn piglets without clinical response after being treated with different broad-spectrum antibiotics. In January and February 2017, five sows from this herd farrowed 58 piglets and among which 45 of them had clinical manifestations consistent with CT soon after birth, and all (100%, 45/45) died within 3 days after the onset of the clinical signs. In March 2017, newborn piglets from a single litter demonstrated repetitive myoclonus suggestive of CT (Video S1); three of them that died spontaneously 3 days after birth were submitted for diagnostic investigation.

2.3 | Pathology

A complete autopsy was performed on the three piglets soon after death; tissue sections (brain, heart, large intestine, lung, kidney with ureters, liver, mesenteric lymph node, spleen, small intestine, spinal cord, tonsil and urinary bladder) were collected, fixed by immersion in 10% buffered formalin solution for 48 hr and then routinely processed for histopathological evaluation with the haematoxylin and eosin (H&E) stain. Furthermore, selected fragments from the brain (cerebrum, cerebellum and brainstem) and spinal cord were stained with a combination of luxol fast blue and cresyl violet HE (LFB-CV) to investigate the possible presence of myelination. In addition, these tissues were compared with age-matched control from a farm without a history of CT.

2.4 | Virology

Selected sections of the CNS (cerebrum, cerebellum and brainstem), tonsils, intestine and faeces were collected and processed for the molecular detection of porcine infectious disease agents. The pathogens investigated consisted of those that have been previously associated with encephalitis and/or myoclonus in swine and included porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV) and Seneca Valley virus (SVV). Conventional molecular assays were performed for partial amplification of the 5'-non-translated (5'-NTR) genomic region of PTV and PSV (Donin et al., 2014; Krumbholz et al., 2003) and the VP3/VP1 genes of SVV (Leme et al., 2015).

For APPV investigation, two different genomic regions of the virus were targeted. First, two primer pairs were designed based on the ISUVDL2014016573 strain (GenBank accession number KU194229) to perform a RT-nested PCR assay for the partial amplification of the conserved region of the non-structural polymerase

gene (NS5B) of the APPV genome. In addition, another set of primers was designed to perform a semi-nested PCR for the partial amplification of the NS2/3 genomic region, based on all the complete nucleotide (nt) sequences available in GenBank at the time (Table 1).

Nucleic acid was extracted from tissue samples (cerebrum, cerebellum, brainstem, tonsil and intestine) and faeces using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate methods (Alfieri, Parazzi, Takiuchi, Medici, & Alfieri, 2006). For both NS5B and NS2/3 partial genes amplification reactions, 5 μ l of the extracted nucleic acid were mixed with 8 μ l of solutions containing 2 μ l of reverse primer (20 pmol/ μ l) and 10 mM of total dNTP, which were denatured at 65°C for 5 min and quickly placed on ice for 5 min. For reverse transcription, 13 μ l of denaturation products were mixed with 7 μ l of solutions containing 4 μ l of 5 \times buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl and 15 mM MgCl₂), 2 μ l 100 mM DTT and 200 U SuperScript II (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The samples were incubated at 42°C for 50 min, followed by enzyme inactivation at 70°C for 15 min. The PCR reactions were performed in final solutions of 50 μ l containing 4 μ l of cDNA, 1 \times PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM of total dNTP, 20 pmol of each primer (forward and reverse) and 2.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen® Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). The cycling profile used for PCR amplifications consisted of an initial denaturation step at 94°C/5 min, followed by 35 cycles at 94°C/1 min, 42°C/1 min, 72°C/1 min and a final extension step at 72°C/7 min.

For both nested and semi-nested assays, reactions were prepared as described above using 2 μ l of the PCR products in the final solutions. The amplification program consisted of 30 cycles, and the annealing temperature of the NS2/3 amplification was 45°C.

The amplicons were purified by a PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and quantified in a Qubit™ Fluorometer, using a Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen® Life Technologies, Eugene, OR, USA). An ABI 3500 Genetic Analyzer and the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) were used for

sequencing, which was performed in both directions with forward and reverse primers. The sequence quality analysis and the contig assembly of NS5B and NS2/3 partial genes sequences were performed with the Phred/CAP3 tool (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). A nt identity matrix was performed using BioEdit software (v. 7.2.5). Phylogenetic trees based on nt sequences were constructed using the neighbour-joining statistical method and the Kimura 2-parameter model in MEGA v.7 and provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Pathological findings

The principal gross lesions included focally extensive congestion of the cervical region (C4-C7) of the spinal cord ($n = 3$), excoriations of the legs ($n = 2$), rib impression on the pleural surface of the lung ($n = 1$) and mesocolonic oedema ($n = 1$). In all animals evaluated, there were no gross lesions on the brain, while the stomachs of two piglets were filled with milk, and there were liquid faeces in the intestines of all three piglets.

The histopathological alterations in the three piglets were similar, with little variation among the tissues evaluated. Histopathology and LFB-CV evaluations of the three piglets revealed evidence of myelin vacuolization with the formation of digestion chambers. These chambers were of different sizes, observed in the white matter of the cerebellum, brainstem and spinal cord and were more easily identified with the LFB-CV stain (Figure 1a-c). In addition, there was severe secondary demyelination with either a complete absence or an inadequate amount of myelin in areas in both the white and grey matter of the spinal cord and brainstem, with mild secondary demyelination in the cerebellum. Moreover, in the affected piglets, there was a clear reduction in the thickness of the myelin sheaths when compared with asymptomatic age-matched control (Figure 1f). Additional remarkable histopathological findings included multifocal neuronal necrosis, neuronophagia and gliosis in the cerebral cortexes and spinal cords of the three piglets with clinical manifestations of CT (Figure 1g-h). Neither white matter vacuolization nor any

TABLE 1 Oligonucleotide primers used in the RT-nested PCR and semi-nested PCR assays for the amplification of the partial NS5B and NS2/3 regions, respectively, of atypical porcine pestivirus

Amplification round	Gene target	Primer	Sequence (5'-3')	Product size
RT-PCR	NS5B	APPV-5B-Fw ^a	ATGTTTCTCAGGGTCGGA	900 bp
		APPV-5B-Rv ^a	GGTCATCTCCGCAGTTA	
nested PCR		APPV-5B-Fw-n ^a	TGTGGAGATGACGGCTTTC	505 bp
		APPV-5B-Rv-n ^a	CGGGATAACTGCGACTGAT	
RT-PCR	NS2/3	APPV-2/3-Fw1 ^b	GCAAAGAAGAATGACTC	703 bp
		APPV-2/3-Rv2 ^b	GGTTTGTCTCATTGCTC	
Semi-nested		APPV-2/3-Rv3 ^b	CCATGTTCTGGGATTG	368 pb

^aPrimer design based on the APPV strain KU194229.

^bPrimer design based on the APPV strains KR011347, KU194229, LT594521, KU041639, NC_030653, KX778724, KY652092, KX929062, KX950762, KY624591.

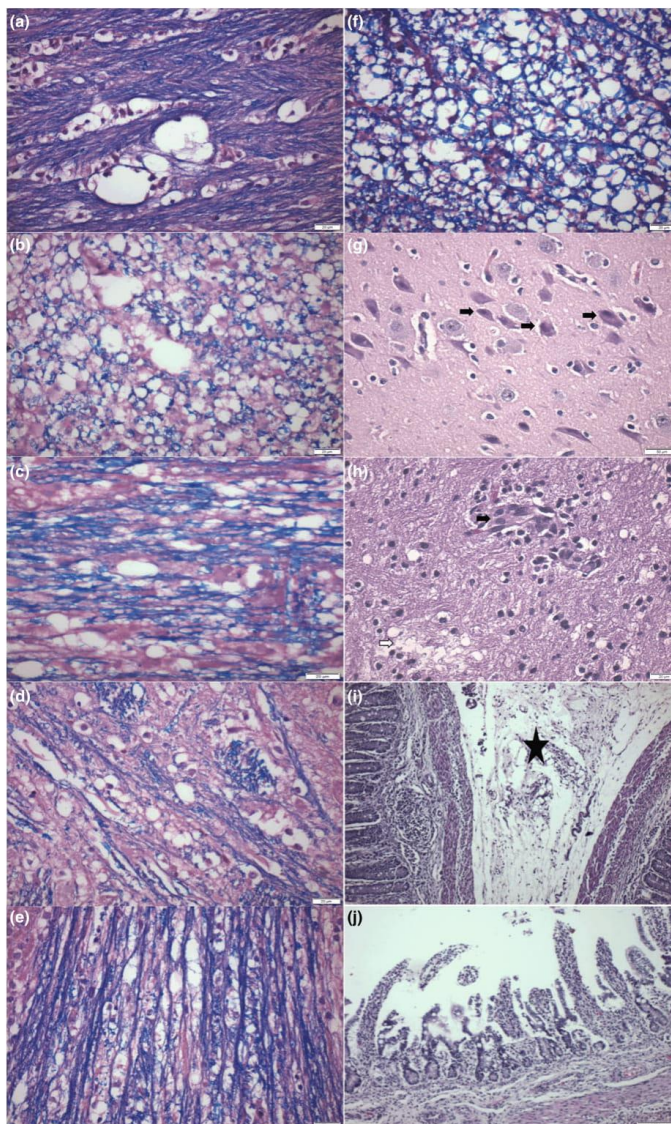


FIGURE 1 Histopathological and histochemical findings observed in piglets coinfecting with atypical porcine pestivirus and porcine teschovirus. Cerebral cortex; observe the marked demyelination with reduction in the myelin fibres (a). Spinal cord; there is demyelination of myelin fibres at the cross- (b) and longitudinal (c) sections of the spinal cord. Observe demyelination at the brainstem (d) and cerebellum (e); compare these to the normal organization of myelin fibres in the spinal cord of a piglet without clinical manifestations of congenital tremor (f). Cerebral cortex demonstrating neuronal necrosis; observe the eosinophilic and shrunken neurons (arrows) relative to the adjacent normal neurons (g). There is neuronophagia (arrow) and demyelination (open arrow) in the white matter of the cerebrum (h) as well as oedema (*) of the colon (i) and atrophic enteritis of the small intestine (j)

neurological impairment was observed in the brains and spinal cords of the asymptomatic piglets used as controls.

Additional significant non-neurological histopathological alterations (Figure 1i-j) included atrophic enteritis ($n = 3$), Peyer's patch hyperplasia ($n = 3$), dilation of interlobular septa ($n = 3$), pulmonary oedema ($n = 2$), petechiae of the renal cortex ($n = 2$), interstitial pneumonia ($n = 2$), colonic oedema ($n = 1$) and hepatic steatosis ($n = 1$).

3.2 | Molecular detection of APPV and PTV

The expected product size of 505 bp of the APPV NS5B partial gene was amplified from the cerebrum and cerebellum of piglet #1 and from the cerebrum of piglet #2. However, all the CNS and tonsil samples of the three piglets were positive for the partial NS2/3 region of the APPV genome. Furthermore, PTV was detected in some samples of the CNS, intestines and faeces (Table 2). The other

TABLE 2 Detection of atypical porcine pestivirus (APPV) and porcine teschovirus (PTV) by RT-nested PCR and/or semi-nested PCR assay in biological samples of congenital tremor-affected newborn piglets

Piglet	Sample	Molecular assays results		
		APPV		PTV
		NS5B	NS2/3	
1	Cerebrum	+	+	+ ^a
	Cerebellum	+ ^a	+	+
	Brainstem	—	+ ^a	—
	Tonsil	—	+	—
	Intestine	—	—	+
	Faeces	—	—	+ ^a
2	Cerebrum	+ ^a	+	—
	Cerebellum	—	+ ^a	—
	Brainstem	—	+	+ ^a
	Tonsil	—	+	+
	Intestine	—	—	+
	Faeces	—	—	+ ^a
3	Cerebrum	—	+	—
	Cerebellum	—	+ ^a	—
	Brainstem	—	+	—
	Tonsil	—	+	+
	Intestine	—	—	—
	Faeces	—	—	+ ^a

+: positive; —: negative.

^aAmplicons submitted to sequencing analysis.

pathological agents investigated were undetected in the samples analysed.

One amplicon of each genomic region of the APPV and amplicons of PTV from each piglet were selected for sequencing analysis

(Table 2). The molecular analysis showed that all nt sequences obtained from the three piglets were 100% identical to each other for both APPV NS5B and NS2/3 partial genes. The Brazilian strain of APPV was named APPV-BR/UJEL-PR01/17 (GenBank accession numbers MG030642, MG030643) and showed the highest nt similarity with the North American ISUVDL2014016573 strain, with values of 94% and 93.9% for the NS5B and NS2/3 partial genes, respectively. The nt similarities of the Brazilian APPV strain with the European and Asian strains varied from 84.9% to 91.3% for the NS5B and from 86.1% to 91.6% for the NS2/3 partial genes. The phylogenetic trees constructed with the NS5B (Figure 2a) and NS2/3 (Figure 2b) partial genes nt sequences demonstrated that the Brazilian APPV strain grouped into the same cluster as the known APPV strains and was distant from other classical pestiviruses. Furthermore, the PTV sequences from the CNS and enteric samples also showed 100% of nt identity.

The secondary demyelination observed by the routine histopathological and histochemical observations in the cerebrum, cerebellum and spinal cord and the molecular findings from the three piglets are consistent with previous descriptions of CT induced by APPV infection in piglets (Postel et al., 2016; Schwarz et al., 2017). However, in previous reports of APPV-induced CT, there were no descriptions of neuronal necrosis. Alternatively, the neuronal necrosis, colonic oedema and/or atrophic enteritis observed in the piglets in this study have been previously described in cases of encephalomyelitis associated with PTV infection (Deng et al., 2012; Salles et al., 2011; Yamada et al., 2009, 2014).

RNA of PTV was amplified from CNS sections of some of the piglets used in this study. The results suggest a dual infection by APPV and PTV in piglets #1 and 2. Although it might be argued that PTV produces predominantly non-suppurative encephalitis and encephalomyelitis (Deng et al., 2012; Salles et al., 2011; Yamada et al., 2009), which were not observed in the cases herein described,

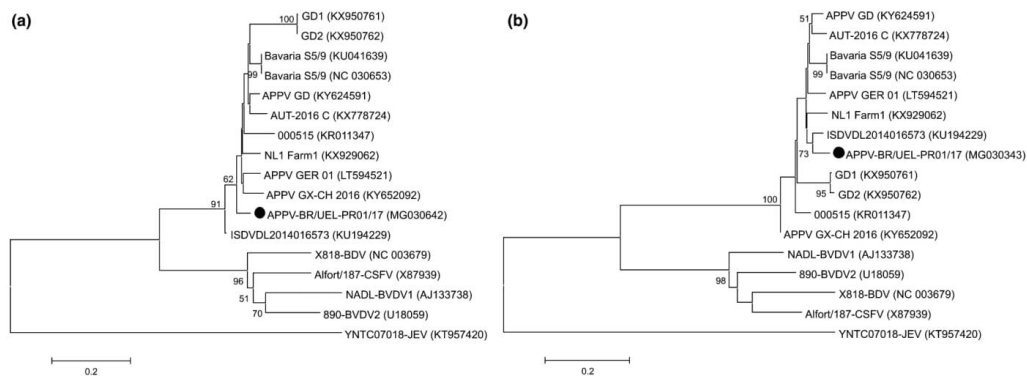


FIGURE 2 Phylogenetic tree of NS5B (a) and NS2/3 (b) partial genes from APPV and classical pestivirus strains (bovine viral diarrhoea virus 1—BVDV1 and 2—BVDV2; classical swine fever virus—CSFV; border disease virus—BDV). The tree was constructed using the neighbour-joining method and Kimura 2-parameter as a nucleotide substitution model. The percentages of bootstrap support (of 1,000 replicates) are shown at each node. The bootstrap values lower than 50% are not shown. The APPV sequence from this study is marked with filled circle. A Japanese encephalomyelitis virus (JEV) strain was used as outgroup

experimental manifestation of histopathological neurological disease induced by PTV was only confirmed 9-day post-inoculation (Yamada et al., 2009). However, the piglets from this study were 3 days old. Furthermore, PTV has demonstrated tropism for neurons of the CNS (Chiu et al., 2014). Collectively, this might suggest that the presence of the typical non-suppurative lesions associated with PTV in the CNS of piglets is time-related and thus justify the absence of these findings in these 3-day-old piglets.

A positive correlation was identified between the villous atrophy (atrophic enteritis), a finding consistent with infection by PTV (Chiu et al., 2012), with recognized viral tropism for the intestine (Chiu et al., 2014). In addition, the PTV genome was detected in the intestines and faeces of evaluated animals. Consequently, we believe that the high lethality rate described in this herd can be associated with the dual infection by APPV and PTV, as, in simultaneous coinfections, PTV might have a synergistic effect on the affected piglets (Chiu et al., 2014), resulting in more severe disease and, therefore, increased mortality of affected animals.

The emergence of CT cases in the evaluated Brazilian pig herd coincided with the introduction of new gilts of genetic line distinct from that usually used in the herd. The same occurred in outbreaks in Germany, as described by Postel et al. (2016).

The results of the molecular assays demonstrated that the primer set that targeted the NS2/3 genomic region was more efficient at amplifying the APPV genome than the NS5B partial gene primers, probably due to the greater number of APPV sequences available and therefore used in NS2/3 primer design. The higher similarities between the NS5B and NS2/3 nt sequences in this study with the North American ISUVDL2014016573 APPV strain suggest that the American strains may have a common ancestor.

To date, APPV has been identified in piglets from North American (Arruda et al., 2016), South American (Mósen et al., 2017), European (de Groof et al., 2016; Postel et al., 2016) and Asian (Yuan et al., 2017; Zhang et al., 2017) countries. To the best of the knowledge of the authors, this is the first report of simultaneous infections by APPV and PTV in symptomatic newborn piglets. The concurrent infection of two viral pathogens that are causative agents of neurological diseases in pigs from a country where neither of these CNS infections have been previously reported emphasizes the susceptibility of Brazilian pig herds to emerging and re-emerging infectious diseases. However, further studies are needed to determine whether APPV is an emerging pathogen or has been silently circulating in Brazilian pig herds for years.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP) and the Araucária Foundation (FAP/PR). Possatti, F., Headley, S.A., Leme, R.A., Dall Agnol, A.M., Oliveira, T.E.S., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A. are recipients of CNPq fellowships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no potential conflict of interests with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

ORCID

S. A. Headley  <http://orcid.org/0000-0002-1614-0185>

R. A. Leme  <http://orcid.org/0000-0002-5911-1261>

A. F. Alfieri  <http://orcid.org/0000-0002-8607-956X>

A. A. Alfieri  <http://orcid.org/0000-0002-7024-4487>

REFERENCES

- Alfieri, A. A., Parazzi, M. E., Takiuchi, E., Medici, K. C., & Alfieri, A. F. (2006). Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, 38, 521-526. <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>
- Arruda, B. L., Arruda, P. H., Magstadt, D. R., Schwartz, K. J., Dohman, T., Schleining, J. A., ... Victoria, J. G. (2016). Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *PLoS ONE*, 11, e0150104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150104>
- Blakemore, W. F., Harding, J. D., & Done, J. T. (1974). Ultrastructural observations on the spinal cord of a Landrace pig with congenital tremor type All. *Research in Veterinary Science*, 17, 174-178.
- Bradley, R., Done, J. T., Hebert, C. N., Overby, E., Askaa, J., Basse, A., & Bloch, B. (1983). Congenital tremor type AI: Light and electron microscopical observations on the spinal cords of affected piglets. *Journal of Comparative Pathology*, 93, 43-59. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(83\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0021-9975(83)90042-7)
- Cano-Gomez, C., Palero, F., Buitrago, M. D., Garcia-Casado, M. A., Fernandez-Pinero, J., Fernandez-Pacheco, P., ... Jimenez-Clavero, M. A. (2011). Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 2144-2150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.014>
- Chiu, S. C., Hu, S. C., Chang, C. C., Chang, C. Y., Huang, C. C., Pang, V. F., & Wang, F. I. (2012). The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 161, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.031>
- Chiu, S. C., Yang, C. L., Chen, Y. M., Hu, S. C., Chiu, K. C., Lin, Y. C., ... Wang, F. I. (2014). Multiple models of porcine teschovirus pathogenesis in endemically infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 168, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.019>
- Deng, M. Y., Millien, M., Jacques-Simon, R., Flanagan, J. K., Bracht, A. J., Carrillo, C., ... Metwally, S. (2012). Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24, 671-678. <https://doi.org/10.1177/1040638712445769>
- Done, J. T. (1968). Congenital nervous diseases of pigs: A review. *Laboratory Animals*, 2, 207-218. <https://doi.org/10.1258/002367768781082861>
- Donin, D. G., Leme, R. A., Alfieri, A. F., Albertson, G. C., & Alfieri, A. A. (2014). First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 523-528. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z>
- de Groof, A., Deijs, M., Guelen, L., van Grinsven, L., van Os-Galdos, L., Vogels, W., ... van der Hoek, L. (2016). Atypical porcine pestivirus: A

- possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. *Viruses*, 8, 271. <https://doi.org/10.3390/v8100271>
- Hause, B. M., Collin, E. A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R. A., ... Anderson, G. (2015). Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *Journal of General Virology*, 96, 2994–2998. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000251>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2016). Virus taxonomy: 2016 release. Available at: <http://www.ictvonline.org/virus-taxonomy.asp> (accessed July, 10, 2017).
- Knox, B., Askaa, J., Basse, A., Bitsch, V., Eskildsen, M., Mandrup, M., ... Rasmussen, F. (1978). Congenital ataxia and tremor with cerebellar hypoplasia in piglets borne by sows treated with Neguvon vet. (metrifonate, trichlorfon) during pregnancy. *Nordisk veterinærmedicin*, 30, 538–545.
- Krumbholz, A., Wurm, R., Scheck, O., Birch-Hirschfeld, E., Egerer, R., Henke, A., ... Zell, R. (2003). Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 113, 51–63. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00227-1)
- Leme, R. A., Zotti, E., Alcantara, B. K., Oliveira, M. V., Freitas, L. A., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2015). Senecavirus A: An emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62, 603–611. <https://doi.org/10.1111/tbed.12430>
- Mósená, A. C. S., Weber, M. N., da Cruz, R. A. S., Cibulski, S. P., da Silva, M. S., Puhl, D. E., ... Canal, C. W. (2017). Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61, 375. <https://doi.org/10.1111/tbed.12753>
- OIE. World Organization for Animal Health (2008). Teschovirus encephalomyelitis. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2. 8. 10. 1146–1152.
- Patterson, D. S., Sweasey, D., Brush, P. J., & Harding, J. D. (1973). Neurochemistry of the spinal cord in British Saddleback piglets affected with congenital tremor, type A-IV, a second form of hereditary cerebrospinal hypomyelination. *Journal of Neurochemistry*, 21, 397–406. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb04259.x>
- Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., ... Becher, P. (2016). Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Scientific Reports*, 6, 27735. <https://doi.org/10.1038/srep27735>
- Salles, M. W. S., Scholes, S. F. E., Dauber, M., Strebelow, G., Wojnarowicz, C., Hassard, L., ... Bollinger, T. K. (2011). Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in Western Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 367–373. <https://doi.org/10.1177/104063871102300231>
- Schwarz, L., Riedel, C., Hogler, S., Sinn, L. J., Voglmayr, T., Wochtl, B., ... Lamp, B. (2017). Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Veterinary Research*, 48, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0406-1>
- Yamada, M., Kozakura, R., Nakamura, K., Yamamoto, Y., Yoshii, M., Kaku, Y., ... Narita, M. (2009). Pathological changes in pigs experimentally infected with porcine teschovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 141, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.05.002>
- Yamada, M., Miyazaki, A., Yamamoto, Y., Nakamura, K., Ito, M., Tsunemitsu, H., & Narita, M. (2014). Experimental teschovirus encephalomyelitis in gnotobiotic pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 150, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.08.004>
- Yuan, J., Han, Z., Li, J., Huang, Y., Yang, J., Ding, H., ... Chen, J. (2017). Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00862>
- Zhang, K., Wu, K., Liu, J., Ge, S., Xiao, Y., Shang, Y., & Ning, Z. (2017). Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1020–1023. <https://doi.org/10.1111/tbed.12659>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Possatti F, Headley SA, Leme RA, et al. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. *Transbound Emerg Dis*. 2018;00:1–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12807>

6 ARTIGO 2

PATHOLOGIC AND MOLECULAR FINDINGS ASSOCIATED WITH ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS INFECTION IN NEWBORN PIGLETS (doi: 10.1016/j.vetmic.2018.10.026)

Veterinary Microbiology 227 (2018) 41–44



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

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



Pathologic and molecular findings associated with atypical porcine pestivirus infection in newborn piglets



Flávia Possatti^a, Thalita Evani Silva de Oliveira^b, Raquel Arruda Leme^{a,c}, Everson Zotti^d, Alais Maria Dall Agnol^e, Alice Fernandes Alfieri^{a,c}, Selwyn Arlington Headley^{b,f}, Amauri Alcindo Alfieri^{a,c,*}

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

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

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

^d Department of Veterinary Medicine, Pontifícia Universidade Católica, Campus Toledo, Paraná, Brazil

^e Center for Agroveterinary Sciences, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brazil

^f Multi-User Animal Health Laboratory, Tissue Processing Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Swine
APPV
Pestivirus
Histopathology
Neurologic alterations
Congenital tremor type A-II

ABSTRACT

Atypical porcine pestivirus (APPV) has been associated with congenital tremor (CT) type A-II in newborn piglets. Although the number of APPV-based studies is increasing, the associated pathologic findings in infected piglets are underreported. This study describes the histopathologic features of spontaneous APPV infection in CT-affected piglets and complements a previous report by our group. Four two-day-old piglets with CT were evaluated by histopathology, immunohistochemistry (IHC), and molecular assay. The main histopathologic findings at the brain and spinal cord included neuronal necrosis, gliosis, neuronophagia, satellitosis, demyelination, Wallerian degeneration, and Purkinje cell necrosis. An IHC assay designed to detect the proliferation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in affected areas of the brain and spinal cord revealed that the proliferation of GFAP+ cells and fibers was predominant in APPV-infected piglets relative to asymptomatic piglets of the same age group. The RT-nested-PCR assays identified APPV RNA in the cerebrum, cerebellum, and brainstem of all piglets; other viruses known to produce similar manifestations were not detected. These results suggest that the APPV-induced histopathologic findings are predominantly degenerative and necrotic and correlate with our previous findings. Consequently, it is proposed that neuronal necrosis, gliosis, neuronophagia, and satellitosis should be considered as important histologic features of APPV-induced infection in symptomatic CT piglets.

1. Introduction

Pestiviruses are spherical, enveloped, linear single-stranded RNA viruses that belong to the *Flaviviridae* family. The four major species within the *Pestivirus* genus are bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV-2), classical swine fever virus (CSFV), and border disease virus (BDV). In 2017, these species were renamed as *Pestivirus A*, *Pestivirus B*, *Pestivirus C*, and *Pestivirus D*, respectively, and seven new species (*Pestivirus E* to *K*) were created (ICTV, 2017).

Atypical porcine pestivirus (APPV) is currently classified as *Pestivirus K* species. This virus was first reported from porcine serum samples in 2015, without being associated with any disease (Hause et al., 2015). In 2016, APPV-induced infection was initially associated with congenital tremor (CT) type A-II in piglets (Arruda et al., 2016).

Thereafter, the viral infection was reported in pig herds from Germany (Postel et al., 2016), Austria (Schwarz et al., 2017), China (Yuan et al., 2017; Zhang et al., 2017), the Netherlands, and Spain (de Groof et al., 2016; Muñoz-González et al., 2017). In Brazil, the first reports of APPV-associated CT cases were in 2017 (Móseno et al., 2018; Gatto et al., 2018; Possatti et al., 2018).

Although the number of APPV-based studies is increasing, the pathologic findings associated with infection in piglets are underreported and not well characterized. We previously described histopathologic findings in piglets coinfecting with APPV and porcine teschovirus, PTV (Possatti et al., 2018), but were unable to effectively associate the pathologic findings with either APPV or PTV. This study investigated the pathologic findings in CT-affected piglets to elucidate and highlight the salient histopathologic features associated with APPV infection.

* Corresponding author at: Rodovia Celso Garcia Cid – Campus Universitário, CEP 86057-970, Londrina, PR, PO Box 10011, Brazil.
E-mail address: alfieri@uel.br (A.A. Alfieri).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.026>

Received 31 August 2018; Received in revised form 22 October 2018; Accepted 25 October 2018
0378-1135/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Main histopathologic findings in the brain and spinal cord of symptomatic piglets with congenital tremor.^a

Piglet #	Main histopathologic alterations								
	Neuronal necrosis	Neuronophagia	Gliosis	Glial nodules	Satellitosis	Demyelination	Wallerian degeneration	Perivascular cuffings	Purkinje cell necrosis
1	+++	+++	+++	++	+++	++	-	-	++
2	+++	++	++	++	++	+++	++	+	++
3	+++	-	++	-	-	++	++	+	++
4	+++	++	++	-	++	-	-	-	-

Legend: (-) : absent; (+) : mild; (++) : moderate; (+++) marked.

^a Cerebrum, cerebellum, and brainstem of all piglets were positive for APPV by RT-nested-PCR assay.

2. Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina under the identification number 11,363.2015.16. Additionally, all applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

The pig herd is in the western region of Paraná state, Southern Brazil and had approximately 1000 sows. In November 2017, there was an outbreak of clinical manifestations consistent with those observed in CT in newborn piglets at this herd. During the first week of the outbreak, first parity sows ($n = 15$) farrowed piglets that presented CT and splay leg soon after birth. Soon after, the litters of other primiparous sows were affected. The outbreak lasted 3 weeks with 30% of mortality rate and was associated with piglet deficiency in suckling resulting in death due to starvation.

Four symptomatic piglets from different affected litters that died spontaneously two days after birth were submitted for autopsy. Tissue fragments of the cerebrum, cerebellum, brainstem, all sections of the spinal cord, lung, heart, tonsil, spleen, lymph nodes, kidney, urinary bladder, liver, and intestines were collected for molecular and pathologic analyses.

The tissues collected for histopathologic analysis were fixed by immersion in 10% buffered formalin solution for 24 h, and then routinely processed with the Hematoxylin and Eosin (H&E) stain. Selected duplicate sections of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections from the brain and spinal cord were evaluated to detect the proliferation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes as described (Oliveira et al., 2017) with modifications, by using a monoclonal antibody against GFAP (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA). With the modified IHC protocol, antigen retrieval was done with citrate buffer for three minutes. Positive controls consisted of FFPE cerebrum sections from health young pig of similar age. Positive and negative controls were included in each assay.

For the molecular analysis, nucleic acid was extracted from tissue samples using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate methods (Alfieri et al., 2006). The RT-nested-PCR assay was performed to amplify a 368 bp-fragment of APPV NS2/3 genomic region, as previously described (Possatti et al., 2018). The cerebrum, cerebellum, and brainstem were also evaluated for infection by porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV) (Krumbholz et al., 2003; Donin et al., 2014), and Seneca Valley virus (Leme et al., 2015). Aliquots of sterile ultrapure water were included as negative controls during the nucleic acid extractions and in all additional procedures.

The amplicons were purified by PureLink[®] Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), quantified in a Qubit[™] Fluorometer, using Quant-iT[™] dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). An ABI 3500 Genetic Analyzer and the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) were used for sequencing, which was performed in both directions with forward and reverse primers. The sequence quality analysis and the contig assembly of the APPV NS2/3 partial gene sequence were performed with Phred/

CAP3 tool (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Nucleotide (nt) identity matrix analysis was performed using BioEdit software (v. 7.2.5).

3. Results

The most significant gross lesions observed at autopsy were rib impressions on the pleural surfaces of the lungs in most piglets ($n = 3$); additional gross lesions were not observed in other organs. The main histopathologic findings observed in each piglet are presented in Table 1 and were less severe in piglet #4. These consisted of neuronal necrosis, gliosis, and neuronophagia with satellitosis particularly at the cerebral cortex and to a lesser extent at the spinal cord, white matter demyelination of the cerebrum and spinal cord, Wallerian degeneration of the spinal cord, and necrosis of Purkinje cells of the cerebellum (Fig. 1A–E). By IHC, the proliferation of GFAP + cells and fibers were more severe and widespread in piglets infected by APPV (Fig. 1F–G) relative to their asymptomatic counterparts (Fig. 1H).

Additional non-neurological histopathologic findings included bronchointerstitial pneumonia with marked vacuolization of the bronchiolar and bronchial epithelium ($n = 3$), lymphocytic hepatitis ($n = 1$), ballooning degeneration of the urinary bladder ($n = 2$), and lymphoid depletion of lymph nodes ($n = 2$) and the tonsils ($n = 2$).

APPV RNA was detected in tissue sections of the cerebrum, cerebellum, and brainstem of all piglets. Additionally, the genome of APPV was detected in tissues of the spinal cord (piglets #2 and 4), lungs and spleen (piglets #1, 2, and 3). Sequencing analysis confirmed the specificity of the amplicon (GenBank accession number MH647708) and revealed 100% of nt identity with the Brazilian APPV strain BR/UEL-PRO1/17 (Possatti et al., 2018). The molecular investigations did not amplify products of PTV, PSV, and SVV in any biological sample derived from the four piglets.

4. Discussion

During this study, the salient histopathologic findings observed in all piglets included neuronal necrosis at the cerebrum and cerebellum, neuronophagia, gliosis in addition to the demyelination characteristic of APPV infection. Previously, we described similar lesions in piglets co-infected with APPV and PTV (Possatti et al., 2018). However, due to the concomitant infection it was not possible to effectively correlate these histologic findings with either etiological agent. Alternatively, in the present study, PTV or other possible viral disease pathogens associated with these lesions were not identified, suggesting that these histopathologic alterations were associated with infection induced by APPV. This hypothesis is supported by results reported by Schwarz et al. (2017) that described focal gliosis in the brain and spinal cord of piglets with APPV-associated CT. Additionally, neuronal necrosis and neuronal phagocytosis are histopathologic findings that have been reported in other pestivirus infections (Blas-Machado et al., 2004; Toplu et al., 2010). Collectively, these findings suggest that neuronal necrosis of the brain, neuronophagia with satellitosis, and gliosis, in addition to the characteristic white matter demyelination and/or hypomyelination,

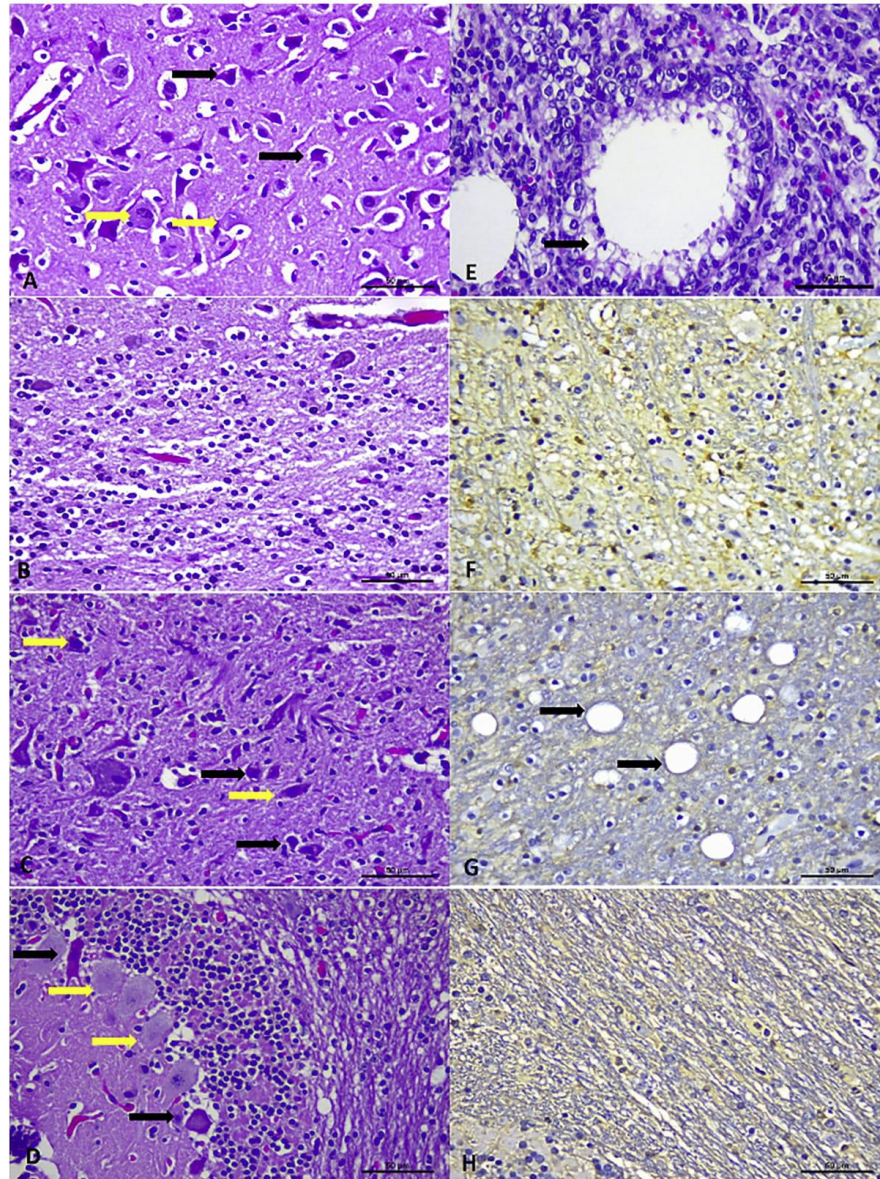


Fig. 1. Histopathologic and immunohistochemical findings observed in an outbreak of APPV in piglets. (A) Cerebral cortical necrosis: compare the necrotic, shrunken, eosinophilic neurons (black arrows) with the normal neurons (yellow arrows). (B) There is gliosis of the cerebral cortex. (C) There is neuronal necrosis (black arrows) and neuronophagia with satellitosis (yellow arrows) at the spinal cord. (D) Cerebellum, necrosis of Purkinje cells: observe the eosinophilic and necrotic Purkinje cells (black arrows) as compared with normal neurons (yellow arrows). (E) Degeneration of bronchiolar epithelium (black arrow). Compare the degree of positive immunoreactivity to GFAP + cells at the brainstem in APPV-infected piglets (F and G) with that of an asymptomatic piglet (H) of the same age range; observe foci of white matter demyelination (G) being enveloped by GFAP + astrocytic fibers (arrows). Haematoxylin and eosin stain, A–E; immunoperoxidase counterstained with haematoxylin, F–H. Bar, A–H, 20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

should be considered as neuropathologic features associated with infection by APPV, and that these lesions are more necrotic than inflammatory.

Moreover, the ballooning degeneration of the uroepithelium and respiratory epithelium observed in these piglets are virus-induced lesions (Oliveira et al., 2017); since other viral disease pathogens were not amplified by molecular assays, one wonders if APPV contributed directly to the development of these non-neurologic alterations. Nevertheless, immunohistochemical assays or transmission electron microscopy analysis would be needed to confirm the participation, if any, of APPV in the pathogenesis of these non-neurologic lesions.

Interestingly, only litters that were farrowed from first parity sows manifested the clinical signs of CT and splay leg. Previously, Postel et al. (2016) reported the occurrence of several CT outbreaks in litters from newly introduced gilts from the same multiplier herd. Collectively, these findings suggest that mature sows provide advantages in the provision of APPV-specific passive immunity to their progeny. The introduction of non-immune gilts in the herd is an important issue and additional studies based on the immunological response and protective colostrum immunity should be done to elucidate this theory.

In conclusion, the age of the affected litters, clinical signs, and molecular and pathologic findings herein described are consistent with APPV-associated CT. The histopathologic identification of neuronal necrosis, neuronophagia with satellitosis, and gliosis in the absence of other viral induced agents, suggest that these lesions were induced by APPV, and provide additional evidence of the causative agent associated with these previously described lesions. A factor that might have triggered the disease occurrence was the introduction of non-immune gilts in the herd. Additional comparative pathologic and immunologic studies should be conducted to elucidate whether there are differences in the APPV pathogenicity in litters delivered from gilts and mature sows.

Conflict of interest

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

Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri AA, Headley SA, Alfieri AF, Oliveira, TES, and Possatti, F. are recipients of CNPq fellowships. Leme RA is recipient of CAPES fellowship.

References

- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Medici, K.C., Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521–526.
- Arruda, B.L., Arruda, P.H., Magstadt, D.R., Schwartz, K.J., Dohlman, T., Schleining, J.A., Patterson, A.R., Visek, C.A., Victoria, J.G., 2016. Identification of a divergent lineage

- porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *PLoS One* 11 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150104>. e0150104.
- Blas-Machado, U., Saliki, J.T., Duff, J.C., Caseltine, S.L., 2004. Bovine viral diarrhoea virus type 2-induced meningoencephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.* 41, 190–194. <https://doi.org/10.1354/vp.41.2.190>.
- de Groof, A., Deijs, M., Guelen, L., van Grinsven, L., van Os-Galdos, L., Vogels, W., Derks, C., Crujisen, T., Geurts, V., Vrijenhoek, M., Suijskens, J., van Doorn, P., van Leengoed, L., Schrier, C., van der Hoek, L., 2016. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. *Viruses* 8, 271. <https://doi.org/10.3390/v8100271>.
- Donin, D.G., Leme, R.A., Alfieri, A.F., Alberton, G.C., Alfieri, A.A., 2014. First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 523–528. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z>.
- Gatto, I.R.H., Harmon, K., Bradner, L., Silva, P., Linhares, D.C.L., Arruda, P.H., Oliveira, L.G., Arruda, B.L., 2018. Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 375–380. <https://doi.org/10.1111/tbed.12824>.
- Hause, B.M., Collin, E.A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R.A., Gauger, P.C., Clement, T., Fang, Y., Anderson, G., 2015. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J. Gen. Virol.* 96, 2994–2998. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000251>.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017. ICTV Taxonomy History. Available at: (Accessed 13 August 2018). https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20173153.
- Krumholz, A., Wurm, R., Scheck, O., Birch-Hirschfeld, E., Egerer, R., Henke, A., Wutzler, P., Zell, R., 2003. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods* 113, 51–63. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00227-1).
- Leme, R.A., Zotti, E., Alcantara, B.K., Oliveira, M.V., Freitas, L.A., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2015. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 603–611. <https://doi.org/10.1111/tbed.12430>.
- Mósen, A.C.S., Weber, M.N., da Cruz, R.A.S., Cibulski, S.P., da Silva, M.S., Puhl, D.E., Hammerschmitt, M.E., Takeuti, K.L., Driemeier, D., de Barcellos, D.E.S.N., Canal, C.W., 2018. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 22–26. <https://doi.org/10.1111/tbed.12753>.
- Muñoz-González, S., Canturri, A., Pérez-Simó, M., Bohórquez, J.A., Rosell, R., Cabezón, O., Segales, J., Domingo, M., Ganges, L., 2017. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1645–1649. <https://doi.org/10.1111/tbed.12699>.
- Oliveira, T.E.S., Michelazzo, M.M.Z., Fernandes, T., de Oliveira, A.G., Leme, R.A., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., Headley, S.A., 2017. Histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural evidence of spontaneous Senecavirus A-induced lesions at the choroid plexus of newborn piglets. *Sci. Rep.* 7, 16555. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16407-0>.
- Possatti, F., Headley, S.A., Leme, R.A., Dall Agnol, A.M., Zotti, E., Oliveira, T.E.S., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2018. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 331–337. <https://doi.org/10.1111/tbed.12807>.
- Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., Derking, S., Tenhundfeld, J., Pfankuche, V.M., Herder, V., Baumgartner, W., Wendt, M., Becher, P., 2016. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci. Rep.* 6, 27735. <https://doi.org/10.1038/srep27735>.
- Schwarz, L., Riedel, C., Hogler, S., Sinn, L.J., Voglmayr, T., Wochtl, B., Dinhopf, N., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., Lading, A., Rumenapf, T., Lamp, B., 2017. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet. Res.* 48, 1. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0406-1>.
- Toplu, N., Oguzoglu, T.C.E., Epikmen, T., Aydogan, A., 2010. Neuropathologic study of border disease virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. *Vet. Pathol.* 48, 576–583. <https://doi.org/10.1177/0300985810371309>.
- Yuan, J., Han, Z., Li, J., Huang, Y., Yang, J., Ding, H., Zhang, J., Zhu, M., Zhang, Y., Liao, J., Zhao, M., Chen, J., 2017. Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. *Front. Microbiol.* 8, 862. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00862>.
- Zhang, K., Wu, K., Liu, J., Ge, S., Xiao, Y., Shang, Y., Ning, Z., 2017. Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1020–1023. <https://doi.org/10.1111/tbed.12659>.

7 CONCLUSÕES

- A reação de *nested*-RT-PCR para amplificação parcial do gene NS2/3 foi mais eficiente que para o gene NS5B.
- Foi detectada pela primeira vez coinfeção de teschovírus suíno e pestivírus suíno atípico em amostras biológicas de leitões com sinais clínicos de tremor congênito.
- Pestivírus suíno atípico induz necrose neuronal, gliose, neuronofagia, satellitose, desmielinização, degeneração walleriana e necrose de células de Purkinje.
- Os achados histopatológicos em leitões infectados por pestivírus suíno atípico foram predominantemente degenerativos e necróticos.
- Desmielinização no sistema nervoso central foi frequente em animais infectados por pestivírus suíno atípico.
- A proliferação de proteínas ácidas fibrilares gliais nas áreas afetadas do cérebro e medula espinhal foi maior nos leitões infectados por pestivírus suíno atípico.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, um número razoável de estudos sobre a infecção por APPV está disponível. Entretanto, as propriedades biológicas do vírus ainda não foram totalmente esclarecidas. Suínos foram utilizados como modelo experimental para estudos sobre as vias de transmissão, dinâmica de infecção e distribuição tecidual do vírus. Do mesmo modo, busca-se por um sistema efetivo de isolamento viral em cultivo celular. Esforços para entender melhor a patogênese e a imunogenicidade do vírus devem ser contínuos. No Brasil, os dados epidemiológicos e moleculares de APPV são escassos. Estudos adicionais e complementares são necessários para melhorar o conhecimento sobre a distribuição e a patogenicidade de cepas brasileiras de APPV, bem como aspectos epidemiológicos da infecção como papel dos portadores assintomáticos na disseminação do vírus, frequência de ocorrência, principais formas de transmissão, taxas de morbidade e letalidade e quantificação dos prejuízos econômicos ocasionados por infecções seguidas de sinais clínicos em leitões recém-nascidos.

ANEXOS

ANEXO A - Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
3. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
4. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
5. Agarose (Invitrogen Life Technologies[®])
6. Água DEPC (Dietil pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
7. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
8. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
9. Anticorpo monoclonal contra GFAP (Zymed Laboratories)
10. Anticorpo secundário (kit de detecção de polímero, Invitrogen Life Technologies[®])
11. Azul de bromofenol (Sigma[®])
12. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
13. Brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
14. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen Life Technologies[®])
15. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
16. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
17. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
19. Diaminobenzidina -DAB (Invitrogen Life Technologies[®])
20. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
21. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[®])
22. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μL ; 25 μmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[®])
23. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Synth[®])
24. Eosina (Nuclear[®])
25. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[®])
26. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merck[®])
27. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
28. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
29. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])

30. Hematoxilina (Nuclear[®])
31. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
32. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
33. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
34. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-5B-Fw (*forward*; 5'-ATGTTTCTCAGGGTCGGA - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-5B-Rv (*reverse*; 5'-GGTCATCTTCCGCAGTTA - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-5B-Fw-n (*forward*; 5'-TGTGGAGATGACGGCTTTC - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
38. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-5B-Rv-n (*reverse*; 5'-CGGGATAACTGCGACTGAT - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
39. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-2/3-Fw1 (*forward*; 5'-GCAAAGAAGAATGACTC - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-2/3-Rv2 (*reverse*; 5'-GGTTTGTCTCATTGCTC - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
41. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) APPV-2/3-Rv3 (*reverse*; 5'-CCATGTTCTTGGGATTG - 3', [nt] X-X); Possatti et al. (2018b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
42. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
43. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 unidades (Invitrogen Life Technologies[®])
44. QuantIT[™] dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies[®])
45. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
46. *Superscript II - Reverse Transcriptase* – 200 unidades (Invitrogen Life Technologies[®])
47. Triton x-100

48. Xileno P.A. (Nuclear®)

ANEXO B - Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

Primers nested-RT-PCR NS5B

Data de fabricação: Dez/2015

- *Primer forward* APPV-5B-Fw

Concentração: 47,6 nmoles

$$47,6 \times 1000 = 47600 \text{ pmoles}$$

$$47600 / 200 = 238 \text{ } \mu\text{L}$$

Primer mãe (200 pmol/ μL): ressuspender em 238 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer reverse* APPV-5B-Rv

Concentração: 61,8 nmoles

$$61,8 \times 1000 = 61800 \text{ pmoles}$$

$$61800 / 200 = 309 \text{ } \mu\text{L}$$

Primer mãe (200 pmol/ μL): ressuspender em 309 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer forward* APPV-5B-Fw-n

Concentração: 56,5 nmoles

$$56,5 \times 1000 = 56500 \text{ pmoles}$$

$$56500 / 200 = 282,5 \text{ } \mu\text{L}$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 282,5 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer reverse* APPV-5B-Rv-n

Concentração: 54,5 nmoles

$$54,5 \times 1000 = 54500 \text{ pmoles}$$

$$54500 / 200 = 272,5 \text{ μL}$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 272,5 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

Primers semi-nested-PCR NS2/3

Data de fabricação: maio/2017

- *Primer forward* APPV-2/3-Fw1

Concentração: 47 nmoles

$$47 \times 1000 = 47000 \text{ pmoles}$$

$$47000 / 200 = 235 \text{ μL}$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 235 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer reverse* APPV-2/3-Rv2

Concentração: 57,1 nmoles

$$57,1 \times 1000 = 57100 \text{ pmoles}$$

$$57100 / 200 = 285,5 \text{ μL}$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 285,5 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer reverse* APPV-2/3-Rv3

Concentração: 28,9 nmoles

$$28,9 \times 1000 = 28900 \text{ pmoles}$$

$$28900 / 200 = 144,5 \text{ } \mu\text{L}$$

Primer mãe (200 pmol/ μ L): ressuspender em 144,5 μ L de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque (100 mM) – 100 μ L de cada dNTP

- solução uso (10 mM) – 10 μ L da solução estoque + 90 μ L de água ultrapura autoclavada

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

- 25 mL de fenol saturado em água

- 24 mL de clorofórmio

- 1 mL de álcool isoamílico

- **Gel de agarose 2%**

- 1 g de agarose

- 50 mL de tampão TBE 1x

- 25 μ L de brometo de etídio

- **Hidratação da sílica**

- 6 g de sílica (SIGMA®)

- Adicionar 50 mL de água ultrapura autoclavada

- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h

- Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante

- Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada

- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar

- Desprezar 44 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0) com HCl fumegantes
- Aliquotar

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton 100x

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**
 - 0,25 g azul de bromofenol (0,25%)
 - 45 g Sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (45%)
 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
 - 107,8 g Tris (0,89 M)
 - 55,03 g ácido bórico (0,89 M)
 - 7,45 g EDTA (0,02 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 1 litro
 - Ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão Fosfato Salina – PBS**
 - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)

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

ANEXO C - Protocolos de Técnicas

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

1. *Suspensão fecal – extração bruta*

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

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

- 1,5 g do fragmento de órgão
- Macerar
- 15 mL de PBS
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 3000 x g/10 min
- Utilizar 250 µL do sobrenadante para extração
- 10 µL de tampão de lise (Proteinase K)
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar a 56 °C/30 min
- Utilizar todo o volume para a extração do ácido nucleico

3. *Extração do ácido nucleico*

Fase I – Fenol

- 400 µL da suspensão fecal ou 200 µL da suspensão de tecido
- Adicionar 40 µL de SDS 10% ou 20 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/20 min

- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Adicionar 400 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x g/10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

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

- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60 °C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56 °C (15 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x *g*/4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar à -20 °C até a utilização

- **Transcrição reversa (RT)**

- Mix de Desnaturação e RT para detecção parcial da região da NS5B do genoma do APPV

Desnaturação (65 °C/5 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Primer</i> APPV-5B-Rv (20 pmol)	2
dNTP (2,5 mM)	1
Água ultrapura	5
RNA	5
Volume final	13

Transcrição reversa (42°C/50 min; 70°C/15 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 5X	4
DTT (100 mM)	2
<i>SuperScript</i> [™] II (200 U/µL)	1
Produto da desnaturação	13
Volume final	20

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR): 900 pb**

- Mix de PCR para detecção parcial da região da NS5B do genoma do APPV

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> [®] Taq DNA Polymerase (5U/ μL)	0,5
<i>Primer</i> APPV-5B-Fw (20 pmol)	1
<i>Primer</i> APPV-5B-Rv (20 pmol)	1
Água ultrapura	36
cDNA	4
Volume final	50

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR

Reação	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	35
Anelamento	42	1	35
Extensão	72	1	35
Extensão final	72	7	1

- **Reação de *nested*-RT-PCR: 505 pb**

- Mix de *nested*-RT-PCR para detecção parcial da região da NS5B do genoma do APPV

Reagentes	Volume (μL)
-----------	--------------------------

<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> [®] Taq DNA Polymerase (5U/μL)	0,5
<i>Primer</i> APPV-5B-Fw-n (20 pmol)	1
<i>Primer</i> APPV-5B-Rv-n (20 pmol)	1
Água ultrapura	38
cDNA	2
Volume final	50

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

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	30
Anelamento	42	1	30
Extensão	72	1	30
Extensão final	72	7	1

- **Transcrição reversa (RT)**

- Mix de Desnaturação e RT para detecção parcial da região da NS2/3 do genoma do APPV

Desnaturação (65 °C/5 min)	
Reagentes	Volume (μL)
<i>Primer</i> APPV-2/3-Rv2 (20 pmol)	2
dNTP (2,5 mM)	1
Água ultrapura	5
RNA	5
Volume final	13

Transcrição reversa (42°C/50 min; 70°C/15 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer 5X</i>	4
DTT (100 mM)	2
<i>SuperScript™ II</i> (200 U/µL)	1
Produto da desnaturação	13
Volume final	20

• **Reação em cadeia da polimerase (PCR): 703 pb**

- Mix de PCR para detecção parcial da região da NS2/3 do genoma do APPV

Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer 10 x</i> (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> (5U/µL)	0,5
<i>Primer APPV-2/3-Fw1</i> (20 pmol)	1
<i>Primer APPV-2/3-Rv2</i> (20 pmol)	1
Água ultrapura	36
cDNA	4
Volume final	50

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
---------------	-------------------------	--------------------	---------------------

Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	35
Anelamento	42	1	35
Extensão	72	1	35
Extensão final	72	7	1

• **Reação de *nested*-RT-PCR: 368 pb**

- Mix de *nested*-RT-PCR para detecção parcial da região da NS2/3 do genoma do APPV

Reagentes	Volume (μ L)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> [®] Taq DNA <i>Polymerase</i> (5U/ μ L)	0,5
<i>Primer</i> APPV-5B-Fw-n (20 pmol)	1
<i>Primer</i> APPV-5B-Rv-n (20 pmol)	1
Água ultrapura	38
cDNA	2
Volume final	50

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

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	30
Anelamento	45	1	30
Extensão	72	1	30
Extensão final	72	7	1

Eletroforese em gel de agarose a 2%

- 1,0 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4
- 25 μ L de brometo de etídio (0,5 μ g/mL)

São utilizados 5 μ L do *amplicon* e 2 μ L do tampão de amostra. Corrida eletroforética sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes por aproximadamente 50 min.

• Purificação de produto de PCR excisado do gel

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

• Purificação direta de produto de PCR

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

5. Adicionar 650 μL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
6. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 30 μL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
11. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
12. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
13. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C .

• **Quantificação de produto de PCR**

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

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

• **Sequenciamento pelo método Sanger**

Preparo de amostras para o sequenciamento

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

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/μL ou $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/μL ou μM)
< 300	2	5

300 – 700	4	5
>700	10	10

Mix do sequenciamento

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

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

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

Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

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

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

Precipitação com EDTA e Etanol

- Adicionar 10 µL da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (*Applied Biosystems*).
- Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.
- Adicionar 30 µL de etanol 100%.

- Homogeneizar lentamente a placa.
- Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2.720 x *g* durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar 10 µL de formamida (HIDI).
- Adicionar a septa.
- Homogeneizar a placa em vórtex.
- Submeter a placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

- **Hematoxilina-eosina (HE)**

- Xilol I – 20 min.
- Xilol II – 20 min.
- Álcool absoluto I – 2 min.
- Álcool absoluto II – 2 min.
- Álcool 95% I – 2 min.
- Álcool 95% II – 2 min.
- Lavar em água destilada – 2 min.
- Corar com hematoxilina (10 min).
- Lavar em água corrente por 10 min, desprezar a primeira água em recipiente apropriado.
- Álcool 95% – 1 min.
- Eosina – 1 min.
- Álcool 95% – 1 min.
- Álcool absoluto I – 2 min.

- Álcool absoluto II – 2 min.
- Xilol I – 2 min.
- Xilol II – 2 min.
- Montar as lâminas.

- ***Luxol Fast Blue (LFB)***

- Desparafinar lâminas e hidratar em álcool 95%.
- Incubar em solução *Luxol Fast Blue* durante a noite a 60 ° C.
- Enxaguar com álcool 95%.
- Enxagar em água destilada.
- Deixar em solução de carbonato de lítio por 5 s.
- Deixar em álcool 70%, duas vezes por 10 s cada.
- Lavar em água destilada.
- Repita os passos 5 a 7 até que haja um contraste nítido entre o azul, a matéria branca e a matéria cinzenta incolor.
- Lavar as lâminas com álcool a 70%.
- Deixar em eosina por 1 min.
- Enxaguar em água destilada.
- Deixar em Cresil violeta por 1 min.
- Enxaguar em água destilada.
- Desidratar com álcool 95% a 100%, lavar em xileno, e cobrir com lamínula.

- **Análise de Proliferação da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)**

- Desparafinar lâminas e hidratar em álcool.
- Recuperar antígeno utilizando tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão por 2 min.
- Realizar bloqueio de peroxidase endógena com metanol e peróxido de hidrogênio (3%) por 25 min.
- Incubar com anticorpo monoclonal contra GFAP diluição 1:50 durante a noite a 4° C.
- Incubar com anticorpo secundário em câmara úmida por 25 min a 25° C, após adição do cromógeno, 3,3'-diaminobenzidina incubar por mais 3 min.
- Fazer contra-coloração com Hematoxilina Harris.
- Montar com resina comercial.

ANEXO D - Lista de softwares

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*

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

- *Gene Runner*

(<http://www.generunner.net/>)

- *MEGA package software version 7*

(<http://www.megasoftware.net/>)

- *BioEdit software version 7.2.5*

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