



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CECÍLIA DE SOUZA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
SAPOVÍRUS EM SUÍNOS ASSINTOMÁTICOS**

Londrina
2011

CECÍLIA DE SOUZA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
SAPOVÍRUS EM SUÍNOS ASSINTOMÁTICOS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729d	<p>Souza, Cecília de. Detecção e caracterização molecular de sapovírus em suínos assintomáticos / Cecília de Souza. – Londrina, 2011. xv, 80 f. : il.</p> <p>Orientador: Amauri Alcindo Alfieri. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Suíno – Infecção – Teses. 3. Suíno – Viroses – Teses. 4. Virologia veterinária – Teses. 5. Virologia molecular – Teses. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 619:636.4</p>
-------	---

CECÍLIA DE SOUZA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE SAPOVÍRUS
EM SUÍNOS ASSINTOMÁTICOS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de março de 2011.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre 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. Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FAP/PR) / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes,
meus avós Fabiano (*in memorian*) e Amélia,
meus pais Nilzo e Josefina,
meus irmãos Eduardo e Luciene,
meu esposo Luiz.

A minha família canina, Laika, Bela e Lola.

A Chopindo e Pooh (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, supremo criador. A Ele toda honra, toda glória, todo louvor e toda adoração.

A minha família, por acreditar em mim. A meus avós, por me ensinarem o sabor do conhecimento; a meus pais, por estarem sempre ao lado, mesmo que distantes; a meus irmãos, pelo exemplo e pelos sorrisos; a meu esposo, pela compreensão e espera; a minha família peluda, por dizerem o que é o amor.

À natureza, obra divina mais esplendorosa. Que inspira e faz acreditar que vale a pena viver só para se ver mais uma vez o encontro do céu com o mar.

Ao professor e orientador Dr. Amauri, pela dedicação e sabedoria transmitidas. A ele minha admiração e respeito.

À professora Dr^a. Alice, por acreditar naquela aluna simples vinda de longe. Muito obrigada pelas portas abertas no início da graduação e por me receber de volta em meu momento de filha pródiga.

Aos membros da banca de qualificação, Prof.^a Dr.^a Alice Fernandes Alfieri e Aline Fernandes Barry e aos membros da banca de defesa, Prof.^a Dr.^a Roberta Lemos Freire e Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas, pelas valiosas contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica de excelência.

À secretária Helenice, pelas muitas ajudas, e a todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Aos amigos que fiz. Maria, adotou-me no coração. Dalíria, sempre cuidando de mim. Kerlei, pelos ensinamentos “enciclopédicos”.

A Elis, pelos muitos (!) ensinamentos e pelo seu tempo, muitas vezes sabidamente escasso. A Juliane, companheira de trabalho. A Raquel, por não me deixar abater. A Thais, pelos momentos em que pude descansar.

Aos amigos de laboratório Claudia, Danilo, Juliana, Marlise, Michele, Noemi, Patrícia, Rodrigo, Vilma e Wagner.

À professora Nilva Aparecida Nicolau Fonseca, pela disponibilidade e atenção quando precisei.

A todos que contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada.

”Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento. O coração do sábio adquire o conhecimento, e o ouvido dos sábios busca a ciência.”

Rei Salomão,
Provérbios 2.6 e 18.15

SOUZA, Cecília de. **Detecção e caracterização molecular de sapovírus em suínos assintomáticos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

RESUMO

A infecção pelo sapovírus suíno (PoSaVs) é frequentemente observada em rebanhos suínos das Américas, Europa e Ásia. A infecção pode se manifestar da forma sintomática, com sinais clínicos de diarreia. Contudo, infecções assintomáticas são descritas com relativa frequência. Existe grande diversidade genética do PoSaV; já foram estabelecidos cinco genogrupos e 16 genótipos e propostos cinco novos genogrupos em estirpes virais de campo. O objetivo deste estudo foi verificar características epidemiológicas e moleculares da infecção pelo PoSaV em suínos assintomáticos. 169 amostras fecais foram coletadas, randomicamente, de 14 rebanhos suínos comerciais, sendo cinco unidades produtoras de leitão (UPL) e nove unidades de terminação (UT) na região oeste do estado do Paraná, Brasil. Foram coletadas amostras de fezes de animais de maternidade ($n=20$), creche ($n=37$), terminação ($n=71$) e reprodução ($n=41$). A presença de PoSaV nas amostras fecais foi avaliada pela técnica de RT-PCR com primers desenhados para amplificar o produto com 331 pb do gene da polimerase viral. PoSaV foi detectado em 10 (71,4%) dos rebanhos incluídos neste estudo. Todas as cinco UPL e cinco (55%) das UT continham animais eliminando o PoSaV pelas fezes. A RT-PCR resultou positiva em 40 (23,7%) das 169 amostras fecais avaliadas. A taxa de positividade por faixa etária animal variou entre 17,1 a 40,5%. A infecção esteve associada à categoria animal, sendo mais frequente em animais de creche ($P \leq 0,05$). A análise filogenética realizada com três estirpes de PoSaV permitiu classificar uma estirpe como genogrupo III genótipo 3 e outras duas como genogrupo IX, recentemente identificado e ainda não descrito no continente americano. Esses resultados demonstram que a infecção pelo PoSaV pode estar amplamente disseminada no rebanho suínico brasileiro, inclusive em animais saudáveis, e que a infecção é mais frequente em animais de creche. As estirpes de campo brasileiras de PoSaV apresentam diversidade genética.

Palavras-chave: Suínos. Fezes. Sapovirus. RT-PCR. RdRp. Filogenia.

SOUZA, Cecília de. **Detection and molecular characterization of porcine sapovirus from asymptomatic pigs.** 2011. 80 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Porcine sapovirus (PoSaVs) infections are frequent in pig herds in America, Europe and Asia. The infection can be symptomatic, in which the typical clinical signs is diarrhea. However, asymptomatic infections are described with relative frequency. The genetic diversity of the PoSaV is high. Five genogroups and 16 genotypes are well established and five genogroups are being proposed in field strains. The aim of this study was to verify epidemiological and molecular characteristics of the PoSaV infection in asymptomatic pigs. A total of 169 fecal samples were randomly collected from 14 commercial pig herds (five breeding herds without growing pigs and nine growing-pig herds) from Western Parana state, Brazil. Fecal samples from nursing piglets ($n=20$), post-weaning pigs ($n=37$), finisher pigs ($n=71$), and breeding animals ($n=41$) were collected. The presence of PoSaV in fecal samples was evaluated by a RT-PCR assay with primers targeting the 331 bp product from the polymerase viral gene. PoSaV was detected in 10 (71.4%) of the pig farms included in this study. All of five breeding herds without growing pigs and 5 (55.5%) of the growing-pig herds had animals shedding PoSaV in the feces. The RT-PCR assay was positive in 40 (23.7%) out of 169 fecal samples evaluated. The rates of positive samples in animal category range from 17.1 to 40.5%. The infection was associated with animal category, being more frequent in post-weaning pigs ($P \leq 0.05$). The phylogenetic analysis carried out in three Brazilian PoSaV strains allowed the classification of one strain in the genogroup III genotype 3 and two other strains in the recently identified genogroup IX, never before described in the American continent. The results showed that the PoSaV infection could be widely disseminate in Brazilian pig herds, even in healthy animals and that the infection is more frequent in weaned pigs in the nursery. The Brazilian PoSaV field strains presented genetic diversity.

Keywords: Swine. Feces. Sapovirus. RT-PCR. RdRp gene. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (2721 nt) dos principais membros da família *Caliciviridae*, representando os cinco gêneros e a estirpe Tulane vírus, do novo gênero proposto, *Recovirus*, utilizando o modelo Kimura 2-parâmetro, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: Sapporo (U65427); Cowden (AF182760); VESV (AF181082); FCV (M86379); Newbury-1 (DQ013304); EBHSV (Z69620); RHDV-FRG (M67473); Tulane vírus (EU391643); Norwalk (M87661); Norovírus suíno (AB074893) 19
- Figura 2** – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (292 nt) das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, com um representante de cada genogrupo. Reconstrução em Kimura 2-parâmetro, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: Sapporo (U65427); London/92 (U95645); Cowden (AF182760); Houston7-1181 (AF435814); Arg39 (AF405715); JJ681 (AY974192); LL26 (AY974195); BRA4-SC/04 (EF183478); Vet25A (FJ854523); Vet2 (FJ854508); MEC 151A (AY144337); Norwalk (M87661) 22
- Figura 3** – Representação da organização genômica do PoSaV na direção 5'-3'. A: As duas ORFs; números indicam a posição dos nucleotídeos. B: Após a tradução, proteínas originadas a partir das ORFs..... 23
- Figura 4** – Microscopia eletrônica de calicivírus humanos clássicos em fezes humanas. Barra 50 nm. Fonte: VINJÉ et al. (2000)..... 24
- ### ARTIGO
- Figura 1** – Nucleotide alignment of the RdRp region of the three porcine SaV strains described in the present study 43

- Figura 2** – Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) computed using Kimura 2-parameter based on the partial RdRp gene (272 nt) from published and Brazilian SaV strains. Strains sequenced in this study are indicated. Bootstrap values $\leq 70\%$ were hidden. Accession numbers for the strains used in the analysis are: BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994), Vet25A (FJ854523), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet2 (FJ854508), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), Cowden (AF182760), BRA12-PR/09 (JF297992), Sapporo (U65427), Arg39 (AF405715), London (U95645), Houston7-1181 (AF435811), Norovirus SW43 (AB074892).....48
- Figura 3** – Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) computed using Kimura 2-parameter based on the partial RdRp gene (305 nt) from published and Brazilian SaV strain. Strain sequenced in this study is indicated. Bootstrap values $\leq 70\%$ were hidden. Accession numbers for the strains used in the analysis are: JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), PECIVA116 (AY615806), Cowden (AF182760), BRA12-PR/09 (JF297992), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), Norwalk (M87661)49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	aminoácido
Ac	anticorpo
CsCl	Cloreto de Césio
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
G-C	guanina-citosina
HuSaV	<i>human sapovirus</i>
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IME	imunomicroscopia eletrônica
Kb	quilobase
KDa	quilodaltons
ME	microscopia eletrônica
MEC	<i>mink enteric calicivirus</i>
NV	<i>Norwalk virus</i>
Nt	nucleotídeo
ORF	<i>open reading frame</i>
pb	pares de base
PEC	<i>porcine enteric calicivirus</i>
pH	potencial de hidrogênio iônico
PoSaV	<i>porcine sapovirus</i>
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa
SaV	Sapovirus
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SLV	<i>Sapporo-like virus</i>
ss-PAGE	<i>silver-strained polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SV	<i>Sapporo virus</i>

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 MERCADO SUINÍCOLA	15
1.3 SANIDADE	17
1.4 FAMÍLIA <i>CALICIVIRIDAE</i>	17
1.5 GÊNERO <i>SAPOVIRUS</i>	20
1.6 SAPOVÍRUS HUMANO	24
1.7 SAPOVÍRUS SUÍNO	26
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
2 OBJETIVO	38
2.1 GERAL	38
2.2 ESPECÍFICOS	38
3 ARTIGO - DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE SAPOVIRUS FROM ASYMPTOMATIC PIGS IN BRAZIL	39
4 CONCLUSÕES	54
APÊNDICES	55
APÊNDICE A	56
APÊNDICE B.....	57
APÊNDICE C.....	58
APÊNDICE D	59
APÊNDICE E.....	60
APÊNDICE F	61
APÊNDICE G	62
APÊNDICE H	63
APÊNDICE I.....	64
APÊNDICE J.....	65
APÊNDICE K	66

ANEXOS	67
ANEXO A	68
ANEXO B	70
ANEXO C	75
ANEXO D	80

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

O agronegócio destaca-se como um dos principais setores produtivos brasileiros e representa mais de 1/3 do produto interno bruto nacional. Nos últimos anos o “Complexo Carnes” (bovina, suína e de frangos) tem-se destacado tanto em termos de volume de produção quanto de qualidade do produto oferecido aos mercados interno e externo (MDIC, 2011). Atualmente, a suinocultura brasileira notabiliza-se pela excelente qualidade dos produtos *in natura* e processados que são produzidos. Os grandes volumes de produção e de recursos financeiros movimentados ratificam a importância dessa cadeia produtiva para toda a economia brasileira. A atividade notabiliza-se ainda por ser grande geradora de empregos diretos e indiretos no campo e nas cidades (ROESLER; CESCNETO, 2003).

Em termos de genética, nutrição, manejo e sanidade a suinocultura brasileira destaca-se pela excelência comparável, ou até mesmo superior, aos principais países produtores do mundo (MAPA, 2011). Porém, a condição sanitária de qualquer rebanho de animais produtores de proteína animal para consumo humano é uma condição extremamente lábil, que deve ser constante e criteriosamente avaliada e monitorada. Algumas doenças infecciosas que comprometem os suínos tem características endêmicas, outras epidêmicas. Vários micro-organismos podem ser responsáveis por infecções singulares ou de etiologia múltipla em suínos e ambas podem ser responsáveis por decréscimo na produtividade.

O objetivo dessa revisão é abordar a infecção viral por sapovírus suíno ainda pouco estudada em rebanhos suínos brasileiros e caracterizar alguns aspectos epidemiológicos da infecção.

1.2 MERCADO SUÍNICO

A carne suína é a mais produzida e consumida no mundo, destacando-se países como Polônia, Hungria, Rússia, China e Dinamarca e a região administrativa especial de Hong Kong como grandes consumidores. A carne suína é responsável por 39% da ingestão

de proteína de origem animal diária no mundo e por 40,41% do total da produção de carnes no mercado mundial, o que corresponde a, aproximadamente, 115 milhões de toneladas (t) de carne, seguida da produção das carnes de aves e bovina. Os maiores produtores de carne suína são Estados Unidos (35%), União Européia (23%), Canadá (21%), Brasil (11%) e China (6%) e os maiores países importadores desta produção são Japão, Federação Russa, México e Coréia do Sul, além da região administrativa especial de Hong Kong. O comércio internacional movimentava cerca de 5,4 milhões t de carne suína, gerando US\$ 11,9 bilhões de receita anual (ABIPECS, 2009). No Brasil, o consumo per capita anual é um pouco superior a 13 kg, com perspectiva de aumento para 15 kg até 2012 (SIMPLÍCIO, 2009). A carne suína é a terceira fonte de proteína animal consumida no país.

No ano de 2010 o Brasil produziu 3,26 milhões t de carne suína, sendo 317 mil t da suinocultura de subsistência e 2,945 milhões t na suinocultura industrial. A atividade suinícola apresenta grande importância econômica e social, gerando aproximadamente 630 mil empregos diretos e indiretos. O país possui um plantel de matrizes industriais de 1,58 milhão de cabeças, com o abate de suínos atingindo 29,1 milhões de cabeças sob Inspeção Federal – SIF. Entre os anos de 2004 e 2009 os abates sob Inspeção Federal aumentaram de 77,7% para 83,1% dos abates totais, confirmando o aumento de garantia da qualidade da carne suína brasileira (ABIPECS, 2009; ABIPECS, 2010a).

Em 2010, para o mercado externo foram enviadas 540 mil t de carne. Os principais importadores da carne suína brasileira foram a Federação Russa, Hong Kong, Ucrânia, Argentina e Cingapura, gerando aproximadamente US\$ 1,34 bilhão. Os principais estados exportadores foram Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Goiás e Minas Gerais (ABIPECS, 2010b).

A atividade suinícola no estado do Paraná é altamente tecnificada e possui padrão de qualidade internacional, com a sanidade e nutrição do plantel equivalentes aos de países desenvolvidos. O estado possui aproximadamente 135 mil propriedades suinícolas, das quais 35 mil são de produção tecnificada, com seu produto inserido no mercado, e 100 mil são propriedades de subsistência. O rebanho é estimado em 4,73 milhões de animais (APS, 2007), sendo o terceiro maior rebanho do Brasil, com a produção destinada 50% para consumo do próprio estado, 44% para outros estados brasileiros e 6% para o mercado externo. A agropecuária paranaense é representativa em termos econômicos no cenário estadual, responsável por grande parte do PIB do Paraná (IPARDES, 2008).

A suinocultura paranaense é significativa nos efeitos sobre renda e emprego, intensificando a demanda de insumos agropecuários e a expansão e modernização dos setores

de comercialização e da agroindústria. Há importante participação da agricultura familiar e das pequenas propriedades, gerando fonte de renda e estabilidade social no campo (ROESLER; CESCNETO, 2003).

1.3 SANIDADE

Diferentes micro-organismos são passíveis de ocasionarem infecções em suínos. A forma de ocorrência destas varia segundo as características do hospedeiro e do meio ambiente, podendo ser de natureza endêmica ou epidêmica. Algumas são sintomáticas enquanto outras podem apresentar-se como assintomáticas. As doenças multifatoriais, aquelas que além de serem de etiologia múltipla caracterizam-se por envolverem fatores ambientais, nutricionais e de manejo, destacam-se na suinocultura tanto pela frequência de ocorrência e pelos prejuízos econômicos que ocasionam, quanto pela dificuldade de diagnóstico, controle e profilaxia. Alguns gêneros dos calicivírus entéricos suínos (*porcine enteric calicivirus* – PEC) caracterizam-se no contexto da sanidade suína como vírus que ocasionam infecções que são, em sua grande maioria, completamente desconhecidas com relação à prevalência e à epidemiologia, como faixa etária de maior susceptibilidade, potencial patogênico, importância sanitária e/ou em termos de saúde pública, bem como de métodos de controle e profilaxia (FARKAS et al., 2005).

1.4 FAMÍLIA *CALICIVIRIDAE*

A primeira descrição de doença em seres humanos associada aos calicivírus ocorreu na década de 1930, por Zahorsky, que a denominou *winter vomiting disease*. Na década de 1940, estudos nos Estados Unidos com filtrados de amostra de fezes provenientes de surtos de gastroenterites indicaram que 75% dos casos não estavam associados a bactérias ou parasitas. Foi então sugerido que os vírus poderiam ser responsáveis pela síndrome (GORDON et al., 1947).

Em 1972, Kapikian e col., por meio de imunomicroscopia eletrônica (IME), observaram partículas virais com diâmetro de 27 nm, que foram associadas com um surto de

diarreia em uma escola na cidade de Norwalk, EUA, em 1968. Essas partículas foram então denominadas *Norwalk virus* (NV).

Posteriormente, em 1976 na cidade japonesa de Sapporo, outros vírus foram identificados em fezes humanas, também por IME, sendo então denominados *Sapporo virus* (SV) (MADELEY; COSGROVE, 1976). Em seguida, foi demonstrado que SV e NV são antigenicamente distintos (CHIBA et al., 1979).

A família *Caliciviridae* foi proposta em 1974, por Burroughs e Brown e descrita pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) em 1979 (CUBBIT, 1994). O nome calicivírus é derivado do latim *calix* e indica as 32 depressões típicas em forma de taças na superfície dos vírions.

A família é composta por cinco gêneros semelhantes em morfologia, porém molecular e antigenicamente distintos: *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* e *Vesivirus* (Fig.1) (ICTV, 2009). *Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus* são, até o momento, vírus exclusivos de animais, enquanto *Novovirus* e *Sapovirus* infectam seres humanos e animais. Recentemente, por meio da caracterização genômica, propôs-se um novo gênero, *Recovirus*, representado pelo Tulane virus, isolado de fezes de macaco *rhesus* (FARKAS et al., 2008). Os calicivírus podem infectar diversas classes de animais como mamíferos (caninos, felinos, suínos, leporinos, símios, bovinos, martas), aves, répteis, anfíbios e insetos, e estão associados a várias patologias, tais como doenças respiratórias, lesões vesiculares, hepatite necrosante e gastroenterite (QUINN et al., 2005).

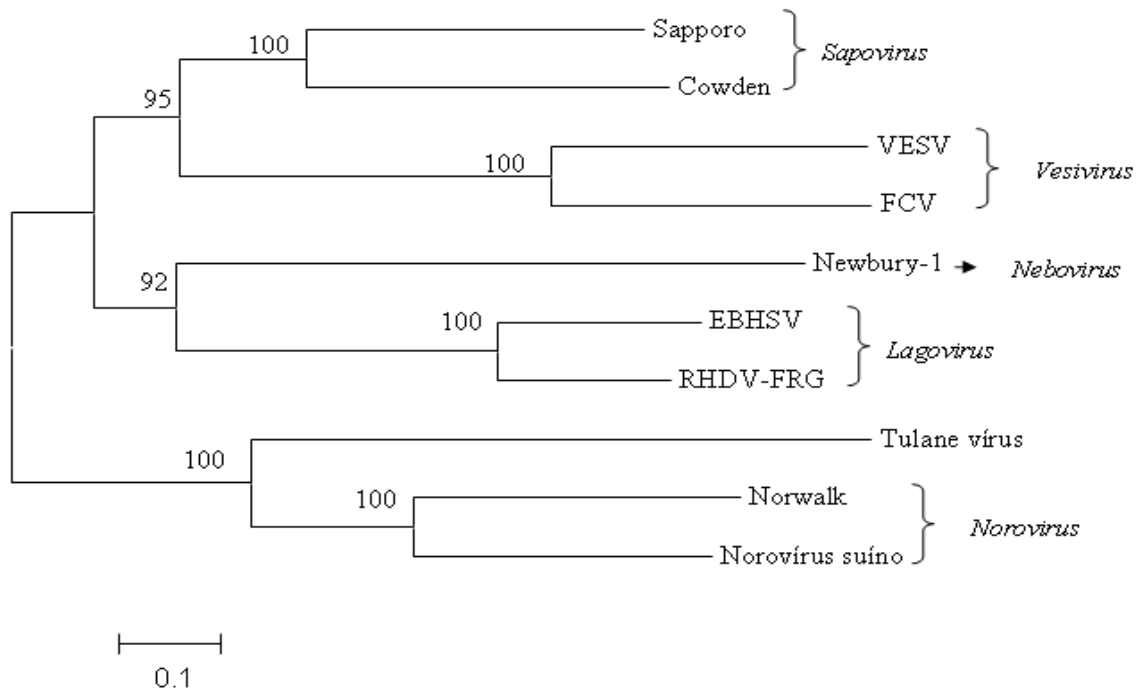


Figura 1 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (2721 nt) dos principais membros da família *Caliciviridae*, representando os cinco gêneros e a estirpe Tulane vírus, do novo gênero proposto, *Recovirus*, utilizando o modelo Kimura 2-parâmetro, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: Sapporo (U65427); Cowden (AF182760); VESV (AF181082); FCV (M86379); Newbury-1 (DQ013304); EBHSV (Z69620); RHDV-FRG (M67473); Tulane vírus (EU391643); Norwalk (M87661); Norovírus suíno (AB074893).

O vírion é pequeno, entre 27-40 nm, não-envelopado, com simetria icosaédrica, composto por 180 moléculas organizadas em 90 dímeros, formando dois domínios, o domínio S e o domínio P. O domínio S compreende a parte interna do capsídeo que reveste o material genético, enquanto o domínio P, subdividido em domínio P1 e P2, confere a arquitetura clássica de “Estrela de Davi”, configuração evidente no gênero *Sapovirus*. O genoma é constituído por uma molécula de RNA fita simples linear de polaridade positiva com 7,4 a 7,7 kb. A densidade das partículas virais em CsCl é de 1,33-1,4g/cm³. O vírion é sensível ao tratamento com tripsina, porém permanece viável em pH 4 e 5 (ICTVdB, 2010), sendo a dose infectante dos vírus entéricos de dez a cem partículas virais

(SCHAUB; OSHIRO, 2000), o que facilita a transmissão viral por meio de gotículas de água, fômites contaminados, contato direto e contaminação ambiental (PARASHAR et al., 2001).

Embora os vírus entéricos sejam genética e morfológicamente diferentes entre si, não há diferença entre as lesões produzidas por calicivírus e as lesões associadas com outros patógenos entéricos (SAIF et al., 1980). Os calicivírus penetram na célula por endocitose e replicam no citoplasma. A entrada, mediada por receptores, é dependente da acidificação dos endossomos (NEILL, 2007). Admite-se que a replicação viral primária ocorra nos enterócitos do duodeno e jejuno em função da observação de várias alterações celulares que podem ser observadas, tais como: encurtamento de vilosidades; fusão ou destruição total das vilosidades intestinais do jejuno e duodeno; hiperplasia das células da cripta, com vacuolização citoplasmática; perda das microvilosidades da borda em escova na superfície das células epiteliais; infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares na lâmina própria (LIV; CRAWFORD, 2005). Os novos vírions são liberados por lise celular.

1.5 GÊNERO *SAPOVIRUS*

O gênero *Sapovirus* comporta a espécie *Sapporo virus*, um vírus entérico. O gênero é classificado, filogeneticamente, em cinco genogrupos com 16 genotipos. Com base na sequência completa do gene do capsídeo, os genogrupos (G seguido de algarismos romanos) e os genotipos (algarismos arábicos) são: GI.1-5, GII.1-6, GIV.1 e GV.1, que englobam os vírus que infectam seres humanos (HANSMAN et al., 2007a; KITAJIMA et al., 2010), e GIII.1-3, que infectam suínos (COLLINS et al., 2009) e tem como protótipo a estirpe viral Cowden descrita, primeiramente, nos EUA em 1980 (SAIF et al., 1980).

Atualmente, com base em comparações das sequências completas do gene que codifica o capsídeo, ou em um fragmento do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) novos genogrupos animais estão sendo propostos, como GVI, GVII, GVIII, GIX e GX, todos de origem suína (WANG et al., 2005; WANG et al., 2007; BARRY et al., 2008; REUTER et al., 2010).

O sapovírus entérico de martas, inicialmente denominado MEC (*mink enteric calicivirus*), foi descrito em um surto de diarreia em um criatório de martas com histórico de pneumonia hemorrágica, nos EUA, no ano de 1983. O vírus foi cultivado em células VERO e, por meio de IME, foram observados típicos calicivírus nas fezes de animais

saudáveis. Análises filogenéticas identificaram o vírus como do gênero *Sapovirus*, porém diferente de todas as estirpes virais até hoje conhecidas, formando um possível novo genogrupo no gênero (EVERMANN et al., 1983). No ano de 2001, o MEC foi detectado em fezes diarreicas de martas jovens, por meio de IME, utilizando-se soro anti PEC/Cowden. Nenhuma outra partícula viral foi observada além da partícula típica de calicivírus (GUO et al., 2001a).

O quadro 1 reúne as principais estirpes virais do gênero sapovírus, distribuídas em genogrupos e genotipos. A figura 2 mostra a árvore filogenética do gênero *Sapovirus*, com um representante de cada genogrupo.

<u>Sapovirus</u>		<u>Genotipo</u>					
<u>Genogrupo</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
<u>I</u>	Sapporo Manchester Mc114 Chiba 980677C	Parkville Houston 27 Potsdan	Stockholm Chiba 010658 Ehine 99- 1389	Chiba 000496	Yokotel Ehime 643		
<u>II</u>	Bristol Mc 2 London 92	Mc 10 Ehime 03-885	Cruise ship? Chiba 040507	Mex 340	Cruise ship?	SK 15	
<u>III</u>	Cowden LL14 PEC IVA116	JB-SC55 Swine-Id3	Swec-VA10 OH-QW152				
<u>IV</u>	Houston 7-1181 Ehimed 1107 SW 278						
<u>V</u>	Arg 39 NK 24						
<u>VI</u> *	JJ681						
<u>VII</u> *	K7JP LL26						
<u>VIII</u> *	BRA SC 04						
<u>IX</u> *	VET 25A						
<u>X</u> *	VET 2						
<u>? (Marta)</u>	MEC 151A						

Quadro 1 – Principais estirpes virais do gênero *Sapovirus* distribuídas em genogrupos e genotipos, com base na sequência do gene da proteína principal do capsídeo viral (GI, II, IV e V) e do gene da polimerase viral (GIII, VI-X).

Cruise ship? : Estirpe ainda incerta quanto ao genotipo

* Genogrupos ainda não estabelecidos

Fontes: Hansman et al., 2007a; Barry et al., 2008; Collins et al., 2009; Kitajima et al., 2010; Reuter et al., 2010.

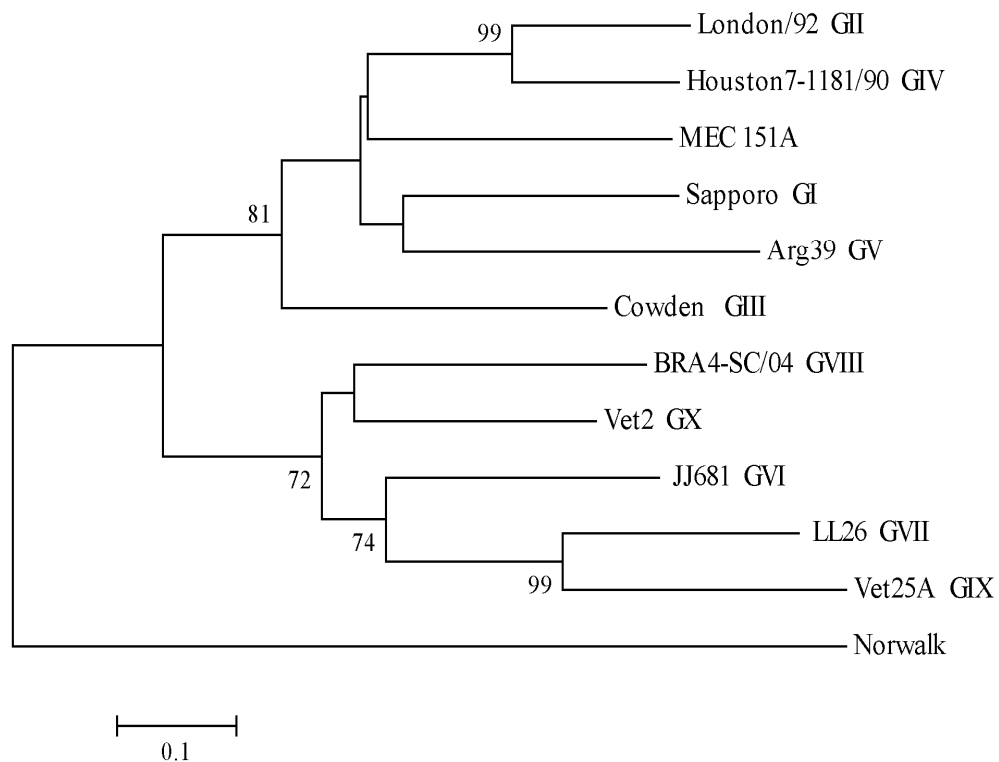


Figura 2 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (292 nt) das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, com um representante de cada genogrupo. Reconstrução em Kimura 2-parâmetro, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: Sapporo (U65427); London/92 (U95645); Cowden (AF182760); Houston7-1181 (AF435814); Arg39 (AF405715); JJ681 (AY974192); LL26 (AY974195); BRA4-SC/04 (EF183478); Vet25A (FJ854523); Vet2 (FJ854508); MEC 151A (AY144337); Norwalk (M87661).

O genoma do sapovírus é constituído por uma molécula de RNA fita simples linear de polaridade positiva que codifica a proteína estrutural do capsídeo de 58-80 kDa, que é dividida em três regiões distintas: região 1 N-terminal altamente conservada; região 2 hipervariável, empregada para determinar similaridade com outras estirpes e que possui determinantes antigênicos, os quais são reconhecidos por anticorpos (Ac) monoclonais; região 3 C-terminal conservada, mas em menor escala do que a região 1 (GUO et al., 1999). A análise da sequência completa da região do capsídeo é o método mais aceito para a classificação definitiva do sapovírus em genogrupos ou genotipos, embora a região da RdRp apresente importantes regiões conservadas e possa também ser utilizada para comparações entre estirpes virais.

O genoma viral é organizado em duas sequências abertas de leitura (ORF – *open reading frame*). A primeira ORF codifica para uma poliproteína que, por clivagem,

origina proteínas não-estruturais, incluindo a RdRp, e também a principal proteína do capsídeo, a VP1. A segunda ORF codifica para uma pequena proteína básica hidrofílica com provável função estrutural, VP2 (GUO et al., 1999; KATAYAMA et al., 2004) (Fig.3). As proteínas não-estruturais denominadas NS1-NS7 são essenciais para a replicação viral.

A:

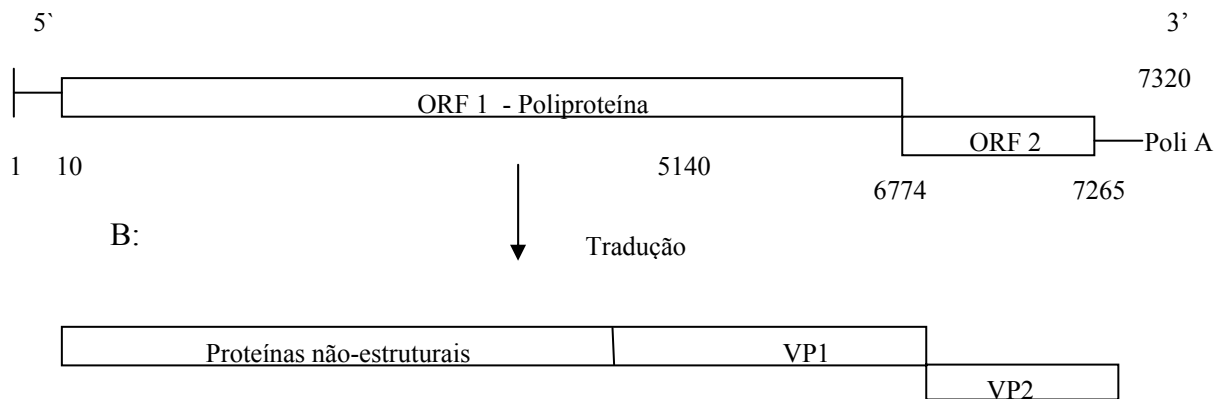


Figura 3 – Representação da estrutura genômica do PoSaV na direção 5'-3'. A: As duas ORFs; números indicam a posição dos nucleotídeos. B: Após a tradução, proteínas originadas a partir das ORFs.

Recombinações são frequentemente descritas entre calicivírus. A maioria dos eventos de recombinação identificados tem sido descrita na junção RdRp-capsídeo, ocorrendo entre membros do mesmo genogrupo e, até mesmo, intergenogrupo (HANSMAN et al., 2005; WANG et al., 2007).

À microscopia eletrônica, os sapovírus tem morfologia clássica, com a configuração de “Estrela de Davi” (PHAN et al., 2006), sendo por isso também denominados calicivírus humanos clássicos (GREEN et al., 2000) (Fig.4).



Figura 4 – Microscopia eletrônica de calicivírus humanos clássicos em fezes humanas. Barra 50 nm.

Fonte: Vinjé et al. (2000).

1.6 SAPOVÍRUS HUMANO

Detectado pela primeira vez em seres humanos, no ano de 1976, o sapovírus humano (HuSaV) foi descrito tanto em fezes de crianças com sinais clínicos de gastroenterite quanto em fezes de crianças assintomáticas. O vírus foi identificado por meio de IME e denominado *Sapporo-like virus* (SLV) e apontado como agente infeccioso para a espécie humana (MADELEY; COSGROVE, 1976).

O nome *Sapporo virus* foi primeiramente empregado em um surto de gastroenterite em um orfanato da cidade de Sapporo, Japão, em outubro de 1977 (CHIBA et al., 1979). As crianças apresentaram sintomas de diarreia, vômito e febre, e a infecção movia-se sucessivamente de um quarto para o outro, o que sugeriu que a propagação ocorria por contato direto (SAKUMA apud CHIBA et al., 2000).

Excluindo-se a infecção por rotavírus grupo A, o HuSaV e o norovírus humano são um dos principais enteropatógenos em seres humanos de todo o mundo. Os HuSaVs infectam principalmente crianças menores de cinco anos, ocasionando diarreia branda na maioria dos casos de infecção com sinal clínico. Casos mais graves são relatados em menor frequência. Geralmente não é observado sangue ou muco nas fezes (PANG et al., 2000; ARAGÃO et al., 2010).

No México, um estudo indicou que 40% dos casos de diarreia por calicivírus em crianças foi causado pelo HuSaV (FARKAS et al., 2000). Em 2010, Svraka e col. relataram um surto de gastroenterite ocasionada por HuSaV, onde a maioria das pessoas infectadas era idosa, acima de 60 anos, sugerindo que a prevalência de sapovirose clínica na

população adulta está aumentando. É possível que HuSaV tenha o mesmo mecanismo de persistência em humanos que o norovírus humano, constituído basicamente por: baixa dose infectante; alta infectividade; alta taxa de excreção viral que persiste mesmo após o final dos sinais clínicos; resistência no meio ambiente e diversas rotas de transmissão.

A infecção mista é muito comum e, por muitas vezes, pode ser a responsável pelo quadro clínico. Vasickova e col. (2005) relataram que infecções mistas de sapovírus, norovírus e astrovírus foram as responsáveis por quadros de gastroenterite aguda na Argentina, Espanha, Finlândia, Holanda, Hungria, Inglaterra, Japão, Paquistão e Rússia.

A principal via de transmissão é a fecal oral, porém a transmissão também ocorre por meio de água ou alimentos contaminados, como por exemplo, mariscos, sem o envolvimento de vetores. Estudos recentes mostram que HuSaV pode ser encontrado em amostras de água doce, sugerindo contaminação fecal humana das águas e também a persistência do vírus em água fresca. SaV ainda não foi encontrado em amostras de água salgada (HANSMAN et al., 2007b), apesar de ser apontado como um dos responsáveis por um surto de gastroenterite associado ao consumo de ostras (NAKAGAWA-OKAMOTO et al., 2009).

O período de incubação viral é de 24 a 48 h e a infecção permanece por três ou quatro dias, sendo muitas vezes autolimitante. Os vírus são excretados nas fezes em baixas concentrações, com início 15 h após a inoculação, com pico de excreção de 25 a 72 h, podendo se estender por até duas semanas. Em pacientes imunocompetentes, raramente a infecção torna-se crônica. Pouco se conhece sobre a imunidade para sapovírus humano, mas acredita-se que ocorra correlação entre a presença de Ac em crianças e a resistência à infecção (FARKAS et al., 2004). Em seres humanos, o tratamento é a terapia de suporte, repondo os fluidos perdidos pelo vômito e diarreia por meio da administração oral ou parenteral.

Chiba e col. (1980) demonstraram a relação entre a presença do vírus nas fezes de crianças e o dia da manifestação de sinais clínicos. Antes das crianças adoecerem, nenhum vírus foi encontrado nas fezes. Porém, após quatro dias de infecção, 95% das amostras fecais eram positivas para o vírus, enquanto que após cinco dias, apenas 50% das amostras continuaram positivas.

Potencialmente, todas as crianças com idade superior a cinco anos já tiveram contato com o vírus, pois há alta taxa de Ac circulantes contra o SaV em crianças nessa idade, indicando que o vírus encontra-se amplamente disseminado em todo o mundo. Em países em desenvolvimento, a imunidade para calicivírus é adquirida entre um e dois anos de idade (GREEN et al., 2007). Em países como Canadá, China, Cingapura, Estados Unidos,

Indonésia, Japão e Papua Nova Guiné 70 a 100% da população adulta apresenta Ac contra o SaV. Embora não muito comum, já foram descritos casos de adultos infectados com sapovírus com sinais clínicos de náusea, diarreia, vômito, desconforto abdominal, cefaleia, mialgia e hipertermia. (JOHANSSON et al., 2005).

No Brasil, HuSaVs foram descritos em crianças com quadro de gastroenterite em Salvador/BA (XAVIER et al., 2009) e também em crianças entre 24 e 30 meses de idade, com grave quadro de diarreia aguda, na cidade de Belém/PA. Este estudo foi realizado com crianças que tinham acesso precário a boas condições sanitárias (ARAGÃO et al., 2010).

Ainda se discute no meio científico a possibilidade de transmissão interespecies do sapovírus. Alguns estudos indicam ser provável que os animais domésticos de produção sejam reservatório para os calicivírus entéricos humanos, pela estreita relação filogenética entre algumas estirpes virais de origem humana e animal (MARTELLA et al., 2008a) e também pela alta variabilidade genética. Considerando tratar-se de um vírus RNA fita simples, a tênue barreira da transmissão interespecie pode ser rompida. Dentre as estirpes virais humanas, o protótipo do genogrupo I.1, Sapporo/82, é a mais próxima, filogeneticamente, das estirpes animais (MATSON et al., 1995); contudo, ainda não há descrição de sapovírus animal infectando seres humanos. Parte da comunidade científica acredita não haver evidência consistente de que animais possam ser fonte de infecção importante de sapovírus para transmissão aos seres humanos (transmissão zoonótica) (BANK-WOLF et al., 2010).

1.7 SAPOVÍRUS SUÍNO

Dentre os gêneros de calicivírus estabelecidos, os gêneros *Sapovirus*, *Norovirus* e *Vesivirus* tem sido detectados em suínos, o que torna essa espécie animal interessante para a realização de estudos com calicivírus.

Os sapovirus de origem suína foram descritos pela primeira vez no ano de 1980, nos EUA, em fezes diarreicas de um leitão de 27 dias de idade (SAIF et al., 1980). A estirpe isolada, Cowden, é o protótipo do genogrupo III e é comumente denominada PEC (*porcine enteric calicivirus*). Atualmente esta estirpe é reconhecida como um calicivírus detectado com frequência em suínos.

Até o momento, a estirpe Cowden é o único membro dos gêneros estabelecidos passível de isolamento em cultivo celular, tanto em células primárias quanto em linhagens celulares contínuas de rim de suínos (LLC-PK) cultivadas em meio enriquecido com conteúdo intestinal filtrado, obtido de suínos gnotobióticos não infectados. É sabido também que ácidos biliares atuam como fator ativador da replicação viral em células LLC-PK (CHANG et al., 2004) e que as múltiplas passagens do PEC em células resultam em adaptação e atenuação da virulência, pois os vírus isolados não mais causam diarreia em suínos gnotobióticos (GUO et al., 2001b).

Em leitões de quatro dias de idade, experimentalmente infectados, a estirpe selvagem Cowden induziu quadro clínico de diarreia branda em todos os animais após três dias da inoculação. A diarreia persistiu por três a sete dias; porém, em dois leitões, após quatro e cinco dias de inoculação, foi observada diarreia grave. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, foram identificadas atrofia e fusão das vilosidades do epitélio do intestino delgado proximal. Partículas virais também foram visualizadas no conteúdo do intestino grosso e nas fezes, porém não foram evidenciados sinais de replicação viral fora do intestino delgado proximal (FLYNN et al., 1988).

A estirpe selvagem Cowden é altamente infecciosa para suínos e foi detectada no soro de suínos gnotobióticos inoculados intravenosa e oralmente. Segundo Guo e col. (2001b), a viremia ocorre após a infecção, sendo tanto o RNA do PEC quanto baixos títulos de antígeno viral detectados no soro destes animais. O soro contém ainda o PEC infeccioso (virion) e quando inoculado pelas vias intravenosa e oral em suínos gnotobióticos induz diarreia e a eliminação do vírus pelas fezes.

O período de incubação é de dois a quatro dias e, quando há quadro clínico, observa-se diarreia por dois a sete dias, com sinais clínicos de letargia e anorexia (KIM et al., 2006; NEILL, 2007). Os sapovírus são detectados com maior frequência em animais de creche, sendo provável que os Ac transferidos pelo colostro (passivos) protejam os leitões lactentes (maternidade). Por sua vez, a menor frequência de detecção do vírus em animais adultos deve-se à imunidade duradoura, adquirida pela infecção natural que ocorre ainda quando na fase de creche.

É provável que a maioria das infecções seja inaparente, podendo o vírus ser detectado em fezes de animais assintomáticos. Em muitos estudos não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre a porcentagem de animais com e sem diarreia que eliminavam o vírus pelas fezes (MARTINEZ et al., 2006). Estas observações sugerem que o vírus não está, necessariamente, associado à diarreia (CUNHA et al., 2010; HALAIHEL et al.,

2010), e a infecção pode causar uma doença branda e autolimitante (MIJOVSKI et al., 2010). Em algumas situações o sapovírus está associado com outros micro-organismos entéricos, ou mesmo o aparecimento e a gravidade dos sinais clínicos podem ser influenciados por condições ambientais e nutricionais.

Possivelmente, a infecção subclínica mantenha o PoSaV em circulação, tanto no plantel quanto no meio ambiente, além de favorecer a recombinação genética, pois diferentes estirpes circulam ao mesmo tempo, levando a alterações na patogenicidade durante a replicação do vírus.

O genoma da estirpe Cowden do PoSaV já foi totalmente sequenciado e, embora haja mutações entre a estirpe selvagem e a estirpe adaptada em cultivo celular, essas diferenças genéticas são devido à adaptação da estirpe à cultura de células. Com base na análise da sequência dos clones de cDNA e nos produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), o RNA genômico é descrito como constituído de 7.320 nucleotídeos (nt), excluindo-se a cauda de poli A da posição 3', com a proporção de 53% no conteúdo de G + C (GUO et al., 1999).

O genoma do PoSaV é constituído por duas ORFs. A primeira ORF codifica para uma poliproteína com 2.254 aminoácidos (aa) que, durante ou após a tradução, é clivada originando as proteínas não-estruturais 2C helicase, 3C-like protease e 3D RNA polimerase RNA dependente, e a proteína principal do capsídeo (VP1), com 544 aa. A poliproteína apresenta sítios altamente conservados, característicos de proteínas não-estruturais dos calicivírus, os quais são GPPGIGKT para 2C helicase, GDCG para 3C-like protease e DYSKW DST, GLPSG e YGDD para 3D RdRp. A segunda ORF é constituída por 495 nt, que codificam para uma pequena proteína básica hidrofílica de 164 aa, com provável função estrutural (GUO et al., 1999).

Acredita-se que o processo da resposta imunológica desenvolvida contra os calicivírus em animais seja análoga à de humanos. É provável que os animais que entram em contato com o vírus fiquem protegidos imunologicamente contra infecções posteriores. É provável ainda que os Ac transferidos via colostro protejam até o desmame (MARTÍNEZ et al., 2006). Em seres humanos soronegativos para o HuSaV observa-se rápido aumento na titulação de Ac pós-infecção que se mantém por até três meses. Por outro lado, os indivíduos com Ac pré-existentes apresentam grande aumento no título somente um mês após a infecção, com declínio no título de Ac após três meses (CHIBA et al., 2000). Com o reconhecimento de uma fase extra-intestinal da infecção pelo PoSaV, é sugestivo que ocorram outras estratégias do sistema imunológico ainda não caracterizadas.

Diferentes procedimentos são utilizados na identificação de calicivírus entéricos suínos. As técnicas de diagnóstico laboratoriais compreendem tanto os ensaios moleculares quanto os não-moleculares e focam na detecção do antígeno e/ou do RNA viral e na resposta de Ac. Dentre os métodos não-moleculares, destaca-se a microscopia eletrônica, limitada em seu uso por ser a visualização das partículas virais dificultada pela baixa concentração de vírus nas fezes; a IME, com maior sensibilidade de detecção, permitindo a identificação da partícula viral com utilização do soro padrão específico. O teste de ELISA foi empregado com sucesso para a detecção da estirpe Cowden em suínos infectados experimentalmente (GUO et al., 2001b). Porém, este teste não detecta infecções causadas por calicivírus antigenicamente não relacionados, sendo a alta especificidade do teste uma desvantagem em estudos epidemiológicos, pois as estirpes virais circulantes tem alta variabilidade genética e, conseqüentemente, antigênica.

Dentre as técnicas moleculares, a mais utilizada é a RT-PCR, seguida do sequenciamento do produto amplificado. Os pares de iniciadores mais utilizados são os desenhados a partir do gene da RNA polimerase viral (RdRp), por ser uma região conservada do genoma dos calicivírus. Porém, também há iniciadores desenhados com base em outras regiões do genoma, como as que codificam proteínas do capsídeo viral. Outros testes moleculares são a RT-PCR em tempo real, a genética reversa (CHANG et al., 2005) e a hibridização em placa (WANG et al., 2006).

O sapovírus suíno não está restrito geograficamente, já tendo sido descrito nos continentes Americano, Europeu e Asiático. Essa ampla difusão geográfica favorece a heterogeneidade genética observada nas estirpes virais selvagens. O quadro 2 mostra a frequência de diagnóstico por RT-PCR e *nested*-PCR do PoSaV em diferentes países, considerando a categoria, o número de animais avaliados e positivos, a faixa etária estudada, a característica das fezes e os genogrupos descritos.

<i>Local</i>	<i>Origem</i>	<i>Idade</i>	<i>Técnica</i>	<i>Genogrupos</i>	<i>Características das fezes</i>	<i>Amostras</i>		<i>Referência</i>
						<i>Total</i>	<i>Positivas (%)</i>	
Japão	1 laboratório de diagnóstico veterinário	< 5 meses	RT-PCR	GVII	diarreicas	24	10 (41,7)	Yin et al. (2006)
Coréia de Sul	78 rebanhos	3 a 70 dias	RT-PCR <i>nested-PCR</i>	GIII	diarreicas	237	69 (29,1)	Jeong et al. (2007)
Itália	118 rebanhos	desmame pós-desmame	RT-PCR	GIII atípicos	diarreicas	209	68 (32,5)	Martella et al. (2008b)
Irlanda	4 rebanhos	4-5 e 8-9 semanas	RT-PCR	GIII GVII	normais	292	7 (2,4)	Collins et al. (2009)
Espanha	12 unidades de terminação 2 unidades produtoras de leitão 1 abatedouro	0 a 24 semanas	RT-PCR	dados não informados	diarreicas normais	221	27 (12,2)	Halaihel et al. (2010)
Europa *	88 rebanhos	< 10 dias a 1 ano	RT-PCR	GIII, GVI-GX	diarreicas normais	1050	80 (7,6)	Reuter et al. (2010)
Venezuela	7 rebanhos	0 a 9 semanas	RT-PCR	GIII	diarreicas normais	204	36 (17,6)	Martínez et al. (2006)
Brasil	34 rebanhos	até 28 dias	RT-PCR	GIII GVIII	diarreicas normais	113	34 (30,1)	Barry et al. (2008)
Brasil	6 rebanhos 1 abatedouro	1 a 26 semanas reprodutores	RT-PCR	GII GVII	diarreicas normais	261	26 (10)	Cunha et al. (2010)

Quadro 2 – Frequência de diagnóstico do sapovírus em fezes de suínos.

*Europa (Dinamarca, Finlândia, Hungria, Itália, Eslovênia e Espanha)

1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suinocultura é uma importante atividade do agronegócio brasileiro, tanto do ponto de vista econômico quanto social. A atividade gera ocupação de mão-de-obra, direta e indiretamente e o país ainda possui áreas para expansão da atividade agropecuária, disponibilidade de água, clima privilegiado e abundante produção de grãos.

A atividade suinícola no país é altamente tecnificada, com intenso processo de criação e padrão sanitário de elevado nível. Contudo, estudos sobre as calicivirose em rebanhos suínos brasileiros ainda são incipientes, tanto em termos de epidemiologia clássica quanto molecular.

Já é de conhecimento que o sapovírus circula no Brasil, tanto na população humana quanto no plantel suinícola, porém ainda carecemos de estudos epidemiológicos sobre a prevalência das sapovirose no plantel nacional e seu impacto na produção de suínos. Necessitamos também de estudos moleculares que caracterizem melhor as estirpes virais circulantes em nossos rebanhos a fim de conhecermos a epidemiologia molecular do vírus, além de reconhecer novos genótipos e/ou novos genogrupos e investigar a possível transmissão zoonótica do SaV.

Muito ainda falta para conhecermos do sapovírus, desde a patogenia viral até sua possível transmissão interespecie, além de aspectos moleculares e epidemiológicos. Por esta razão, a proposta deste estudo é de contribuir com o conhecimento sobre a sapovirose suína em granjas produtoras de leitão e de terminação, por meio da análise de amostras provenientes da região oeste do estado do Paraná, área de grande importância no mercado suinícola nacional. Com isso, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença do sapovírus suíno nos rebanhos estudados e conhecer a posição filogenética de algumas estirpes virais identificadas.

Essa pesquisa contribui com conhecimentos relacionados com a análise do impacto das calicivirose nos rebanhos suínos, além de auxiliar na seleção de medidas de controle e profilaxia direcionadas para a sanidade suinícola.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS. Associação brasileira da indústria produtora e exportadora de carne suína. 2009. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2009_pt.pdf>. Acesso em: 13 set. 2010.
- ABIPECS. Associação brasileira da indústria produtora e exportadora de carne suína. 2010a. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-interno.html>>. Acesso em: 7. mar. 2011.
- ABIPECS. Associação brasileira da indústria produtora e exportadora de carne suína. 2010. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-externo>>. Acesso em: 13 set. 2010.
- ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2010.
- APS. Associação Paranaense de suinocultores. 2007. Disponível em: <<http://www.aps.org.br/estatisticas/rebanho.html>>. Acesso em: 15 set.2010.
- BANK-WOLF, B. R.; KÖNIG, M.; THIEL, H. J. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 204-212, 2010.
- BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 185-191, 2008.
- BURROUGHS, J. N.; BROWN, F. Physico-chemical evidence for the re-classification of the Caliciviruses. **Journal of General Virology**, v. 22, p. 281-286, 1974.
- CHANG, K. O.; SOSNOVTSEV, S. S.; BELLLOT, G.; WANG, Q.; SAIF, L. J.; GREEN, K. Y. Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the *Caliciviridae*. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1409-1416, 2005.
- CHIBA, S.; SAKUMA, Y.; KOGASAKA, R.; AKIHARA, M.; HORINO, K.; NAKAO, T.; FUKUI, S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. **Journal of Medical Virology**, v. 4, p. 249-254, 1979.
- CHIBA, S.; SAKUMA, Y.; KOGASAKA, R.; AKIHARA, M.; TERASHIMA, H.; HORINO, K. Fecal shedding of virus in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 142, p. 247-249, 1980.
- CHIBA, S.; NAKATA, S.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S. Sapporo virus: history and recent findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, Suppl2, p. S303-S308, 2000.
- CHANG, K. O.; SOSNOVTSEV, S. V.; BELLLOT, G.; KIM, Y.; SAIF, L. J.; GREEN, K. Y. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-

- regulation of signal transducer and activator of transcription 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 23, p. 8733 – 8738, 2004.
- COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.; O'SHEA, H. Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 176-182, 2009.
- CUBBIT, W. D. Caliciviruses: In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infection of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 549-568.
- CUNHA, J. B.; MENDONÇA, M. C. L.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G. Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1301-1305, 2010.
- EVERMANN, J. F.; SMITH, A. W.; SKILLING, D. E.; McKEIRNAN, A. J. Ultrastructure of newly recognized caliciviruses of the dog and mink. **Archives of Virology**, v. 76, p. 257-261, 1983.
- FARKAS, T.; JIANG, X.; GUERRERO, M. L.; ZHONG, W.; WILTON, N.; BERKE, T.; MATSON, D. O.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. **Journal of Medical Virology**, v. 62, p. 217-223, 2000.
- FARKAS, T.; ZHONG, W. M.; JING, Y.; HUANG, P. W.; ESPINOSA, S. M.; MARTINEZ, N.; MORROW, A. L.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; PICKERING, L. K.; JIANG, X. Genetic diversity among sapoviruses. **Archives of Virology**, v. 149, p. 1309-1323, 2004.
- FARKAS, T.; NAKAJIMA, S.; SUGIEDA, M.; DENG, X.; ZHONG, W.; JIANG, X. Seroprevalence of noroviruses in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 657-661, 2005.
- FARKAS, T.; SESTAK, K.; WEI, C.; JIANG, X. Characterization of a Rhesus Monkey Calicivirus Representing a New Genus of *Caliciviridae*. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5408-5416, 2008.
- FLYNN, W. T.; SAIF, L. J.; MOORHEAD, P. D. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 819-825, 1988.
- GORDON, I.; INGRAHAM, H. S.; KORNS, R. F. Transmission of epidemic gastroenteritis of human volunteers by oral administration of fecal isolates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 86, p. 409-422, 1947.
- GRREN, K. Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M. S.; BERKE, T.; CLARKE, I. N.; ESTES, M. K.; MATSON, D. O.; NAKARA, S.; NEIL, J. D.; STUDDERT, M. J.; THIEL, H. J. Taxonomy of the Caliciviruses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. s322-330, 2000.
- GREEN, K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 950-979.

GUO, M.; CHANG, K. O.; HARDY, M. E.; ZHANG, Q.; PARWANI, A. V.; SAIF, L. J. Molecular Characterization of a Porcine Enteric Calicivirus Genetically Related to Sapporo-Like Human Caliciviruses. **Journal of Virology**, v. 73, n. 11, p. 9625-9631, 1999.

GUO, M. EVERMANN, J. F.; SAIF, L. J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. **Archives of Virology**, v. 146, p. 479-493, 2001a.

GUO, M.; HAYES, J.; CHO, K. O.; PARWANI, A. V.; LUCAS, L. M.; SAINF, L. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. **The Journal of Virology**, v. 75, p. 9239-9251, 2001b.

HALAIHEL, N.; MASIA, R. M.; FERNÁNDEZ-JIMÉNES, M.; RIBES, J. M.; MONTAVA, R.; BLAS, I. DE; GIRÓNES, O.; ALONSO, J. L.; BUESA, J. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 138, p. 542-548, 2010.

HANSMAN, G. S.; TAKEDA, N.; OKA, T.; OSETO, M.; HEDLUND, K.; KATAYAMA, K. Intergenogroup recombination in Sapoviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1916-1920, 2005.

HANSMAN, G. S.; OKA, T.; KATAYAMA K.; TAKEDA, N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. **Journal of Medical Virology**, v. 17, p. 133-141, 2007a.

HANSMAN, G. S.; SANO, S.; UEKI, Y.; IMAI, T.; OKA, T.; KATAYAMA, K.; TAKEDA, N.; OMURA, T. Sapovirus in water, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 133-135, 2007b.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2009. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 19 out. 2010.

ICTVdB. **The universal virus database of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2010. Disponível em: <<http://www.ictvdb.org/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 19 out. 2010.

IPARDES. **Sobre o Paraná**. 2008. Disponível em: <<http://www.ipardes.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=86>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

JEONG, C.; PARK, S. I.; PAR, S. H.; KIM, H. H.; PARK, S. S.; JEONG, J. H.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; HYUN, B. H.; CHO, K. O. Genetic diversity of porcine sapoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 246-257, 2007.

JOHANSSON, P. J.; BERGENTOFT, K.; LARSSON, P. A.; MAGNUSSON, G.; WIDELL, A.; THORHAGEN, M.; HEDLUND, K. O. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 200-204, 2005.

- KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R. THORNHILL, T. S.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. **The Journal of Virology**, v. 10, p. 1075-1081, 1972.
- KATAYAMA, K.; MIYOSHI, T.; UCHINO, K.; OKA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, N.; HANSMAN, G. S. Novel recombinant sapovirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1874-1876, 2004.
- KIM, H. J.; CHO, H. S.; CHO, K. O.; PARK, N. Y. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 155-159, 2006.
- KITAJIMA, M.; OKA, T.; HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K.; OHGAKI, S. detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2461-2467, 2010.
- LIV, C.; CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: Bases patológicas das doenças: Robbins & Cotran**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.837-918.
- MADELEY, K. L.; COSGROVE, B. P. Caliciviruses in man. **Lancet**, v. 307, n. 7952, p.199-200, 1976.
- MAPA. **Suínos**. 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 8 fev.2011.
- MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BANYAYI, K.; DECARO, N.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; RADOGNA, A.; CONSTANTINI, V.; SAIF, L.J.; LAVAZZA, A.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1907-1913, 2008a.
- MARTELLA, V. BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A. L.; DECARO, MARI, V.; SAIF, L.; CONSTANTINI, V.; GRAZIA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Genetic heterogeneity of porcine caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. **Virus Genes**, v. 36, p. 365-373, 2008b.
- MARTÍNEZ, M. A.; ALCALÁ, A. C.; CARRUYO, G.; BOTERO, L.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p. 77-84, 2006.
- MATSON, D. O.; ZOHAN, W. N.; JIANG, X.; PICKERING, L. K.; NAKATA, S.; NUMATA, K.; CHIBA, S.; ESTES, M. K. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. **Journal of Medical Virology**, v. 45, p. 215-222, 1995.
- MDIC. **A cadeia produtiva de carnes**. 2011. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=855>>. Acesso em: 8 fev. 2011.

- MIJOVSKI, J. Z.; POLJŠAK-PRIJATELI, M.; STEYER, A.; BARLIC-MAGANJA, D.; KOREN, S. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 413-420, 2010.
- NAKAGAWA-OKAMOTO, R.; ARITA-NISHIDA, T.; TODA, S.; KATO, H.; IWATA, H.; AKIYAMA, M.; NISHIO, O.; KIMURA, H.; NODA, M.; TAKEDA, N.; OKA, T. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oysters-associated outbreak. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 63-66, 2009.
- NEILL, J. Caliciviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p.525-535.
- PANG, X.; HONMA, S.; NAKATA, S.; VESIKARI, T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181 (Suppl 2), p. 288–294, 2000.
- PARASHAR, U.; QUIROZ, E. S.; MOUNTS, A. W.; MONROE, S. S.; FANKHAUSER, R. L.; ANDO, T.; NOEL, J. S.; BULENS, S. N.; BEARD, S. R.; LI, J. F.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 50, p. 1-17, 2001.
- PHAN, T. G.; TRINH, Q. D.; YAGYU, F.; SUGITA, K. OKITSU, S.; MULLER, W. E.; USHIJIMA, H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan, during 2004-2005. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 839-846, 2006.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Caliciviridae. In: _____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.398-401.
- REUTER, G.; ZIMŠEK-MIJOVSKI, J.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; BARTOLO, I.; RUGGERI, F. M.; KANTALA, T.; MAUNULA, L.; KISS, I.; KECSKEMÉTI, S.; HALAIHEL, N.; BUESA, J.; JOHNSEN, C.; HJULSAGER, C. K.; LARSEN, L. E.; KOOPMANS, M.; BÖTTIGER, B. Incidence, diversity and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 363-368, 2010.
- ROESLER, M. R. V. B.; CESCONETO, E. A. A produção de suínos e as propostas de gestão de ativos ambientais: o caso da região de Toledo – Paraná. **Informe Gepec**, Toledo, v. 7, n. 2, 2003. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/gepec/issue/view/90>>. Acesso em: 15 set.2010.
- SAIF, L. J.; BOHL, E. H.; THEIL, K. W.; CROSS R. F.; HOUSE, J. A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, p. 105–111, 1980.
- SCHAUB, S. A.; OSHIRO, R. K. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. S374 - S380, 2000.

SIMPLÍCIO, R. Para CNA, consumo de suínos no Brasil “ainda engatinha”. 2009. Disponível em: <http://porkworld.com.br/noticias/post/231009-pnds-para-cna-consumo-de-suinos-no-brasil-quotainda-engatinhaquot-_16956>. Acesso em: 13 set. 2010.

SVRAKA, S.; VENNEMA, H.; VEER, B. V. D.; HEDLUND, K. O.; THORHAGEN, M.; SIEBENGA, J.; DUIZER, E.; KOOPMANS, M. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2191-2198, 2010.

VASICKOVA, P.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; PAVLIK, I. Virus as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. **Veterinary Medicine**, v. 50, n. 3, p. 99-104, 2005.

VINJÉ, J.; DEIJE, H.; HEIDE, R.; LEWIS, D.; HEDLUND, K.; SVENSSON, L.; KOOPMANS, M. P. G. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-Like Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 530-536, 2000.

WANG, Q. H.; HAN, M. G.; FUNK, J. A.; BOWMAN, G.; JANIES, D. A.; SAIF, L. J. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5672-5963, 2005.

WANG, Q. H.; SOUZA, M.; FUNK, J. A.; ZHANG, W.; SAIF, L. J. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2057-2062, 2006.

WANG, Q.; COSTANTINI, V.; SAIF, L. J. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5453-5466, 2007.

XAVIER, M. P. T. P.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; MIRANDA, V.; SILVA, M. F. M.; STRINA, A.; BARRETO, M. L.; MIAGOSTOVICHT, M. P.; LEITE, J. P. G. Detection of caliciviruses associated with acute gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 438-444, 2009.

YIN, Y.; TOHYA, Y.; OGAWA, Y.; NUMAZAWA, D.; KATO, K.; AKASHI, H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1749-1759, 2006.

ZAHORSKY, J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. **Archives of Pediatrics**, v. 46, p. 391-395, 1929.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Avaliar a presença de sapovírus em fezes de suínos assintomáticos de diferentes faixas etárias provenientes de rebanhos da região oeste do estado Paraná.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de PoSaV em fezes de suínos assintomáticos utilizando a técnica RT-PCR;
- Avaliar características epidemiológicas como frequência de ocorrência da infecção e faixa etária animal mais susceptível;
- Sequenciar produtos amplificados e realizar a análise filogenética de estirpes virais de PoSaV detectadas.

3 ARTIGO

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE SAPOVIRUS FROM ASYMPTOMATIC PIGS IN BRAZIL

Abstract

Porcine sapovirus (PoSaVs) infections are frequent in pig herds in America, Europe and Asia. The infection can be symptomatic, in which the typical clinical signs is diarrhea. However, asymptomatic infections are described with relative frequency. The genetic diversity of the PoSaV is high. Five genogroups and 16 genotypes are well established and five genogroups are being proposed in field strains. The aim of this study was to verify epidemiological and molecular characteristics of the PoSaV infection in asymptomatic pigs. A total of 169 fecal samples were randomly collected from 14 commercial pig herds (five breeding herds without growing pigs and nine growing-pig herds) from Western Parana state, Brazil. Fecal samples from nursing piglets ($n=20$), post-weaning pigs ($n=37$), finisher pigs ($n=71$), and breeding animals ($n=41$) were collected. The presence of PoSaV in fecal samples was evaluated by a RT-PCR assay with primers targeting the 331 bp product from the polymerase viral gene. PoSaV was detected in 10 (71.4%) of the pig farms included in this study. All of five breeding herds without growing pigs and 5 (55.5%) of the growing-pig herds had animals shedding PoSaV in the feces. The RT-PCR assay was positive in 40 (23.7%) out of 169 fecal samples evaluated. The rates of positive samples in animal category range from 17.1 to 40.5%. The infection was associated with animal category, being more frequent in post-weaning pigs ($P<0.05$). The phylogenetic analysis carried out in three Brazilian PoSaV strains allowed the classification of one strain in the genogroup III genotype 3 and two other strains in the recently identified genogroup IX, never before described in the American continent. The results showed that the PoSaV infection could be widely disseminate in Brazilian pig herds, even in healthy animals and that the infection is more frequent in weaned pigs in the nursery. The Brazilian PoSaV field strains presented genetic diversity.

Keywords: Swine. Feces. Sapovirus. RT-PCR. RdRp gene. Phylogeny.

Introduction

In animals, sapoviruses (SaVs) were described infecting pigs and mink (Guo et al., 2001). In humans, SaVs are usually associated with mild diarrheic disease, more often in children, but severe cases can also occur (Pang et al., 2000; Aragão et al., 2010).

Porcine sapoviruses (PoSaVs) infections are reported in America (Barry et al., 2008a; Cunha et al., 2010), Europe (Reuter et al., 2010), and Asia (Nakamura et al., 2010). PoSaVs, historically called porcine enteric caliciviruses – PEC, can cause gastroenteritis in pigs and in young pigs can be associated with diarrhea (Guo et al., 1999); however, the

clinical signs are usually mild enteritis or even asymptomatic infection (Reuter et al., 2007; Mijovski et al., 2010). Occasionally, mixed infection or nutritional and environmental factors could also explain clinical signs in diarrheic piglets positive to PoSaVs (Martella et al., 2008a; Mauroy et al., 2008)

Sapoviruses belong to the family *Caliciviridae*, genera *Sapovirus*. The genome consists of a polyadenylated single-stranded positive sense RNA and organized in two open reading frames (ORFs). The ORF 1 encodes non-structural proteins, including the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the capsid protein VP1. The ORF 2 encodes the small basic hydrophilic protein VP2, with probably structural function (Guo et al., 1999; Katayama et al., 2004). VP1 is the main capsid protein, and is divided into regions. Regions 1 and 3 are more conserved, and region 2 is very variable, with antigenic determinants that lead to antibodies response.

Nowadays SaVs strains are classified into five genogroups based on VP1 gene. The genogroups I, II, IV, and V include human virus strains isolated, with 13 genotypes: GI - 1 to 5; GII – 1 to 6; GIV – 1, and GV - 1 (Hansman et al., 2007; Kitaiima et al., 2010). The genogroup III has been detected only in pigs, with the Cowden^{3'} strain prototype (Wang et al., 2005). Based on genetic variability in the PoSaV strains, the genogroup III could be divided into three clusters (genotypes 1, 2, and 3) (Collins et al., 2009).

Sapoviruses are genetically variable and although most porcine sapoviruses are characterized as Cowden-like GIII SaVs, several porcine strains have been characterized as genetically distant to typical PoSaV genogroup III. Recently, new porcine genogroups are proposed, expanding porcine genogroups to GVI, GVII, and GVIII (Wang et al., 2005; Wang et al., 2007; Barry et al., 2008b) and, more recently, GIX and GX (Reuter et al., 2010), based on comparisons of complete capsid sequences or on a small polymerase fragment. There is also the description of genetic recombination of porcine sapoviruses, which increases diversity among the genotypes or genogroups (Wang et al., 2005; Jeong et al., 2007). In addition, Guo et al. (2001) proposed mink enteric calicivirus as a new genogroup in genera *Sapovirus*.

Phylogenetic studies indicated that some PoSaVs strains are closely related to human SaVs, suggesting a potential cross-species transmission and the possibility of a swine reservoir for human strain and vice-versa (Martella et al., 2008b), although animal viruses have not been detected in human stool samples until now. Perhaps zoonotic

transmission is a rare event or PoSaVs are not infectious to humans (Martinez et al., 2006; Bank-Wolf et al., 2010).

Recently, a study performed by our group described that the infection can occur in equal frequencies in diarrheic and healthy piglets (Barry et al., 2008b). Other studies have also been showed the PoSaV infection in asymptomatic pigs (Cunha et al., 2010; Halaihel et al., 2010). The aim of this study was to determine epidemiological aspects of the PoSaV infection in healthy pigs.

Materials and Methods

Herds and fecal samples

In June 2009, a total of 169 fecal samples were randomly collected from 14 commercial pig farms (five breeding herds without growing pigs and nine growing-pig herds) from the west region of Parana state, Toledo district (24°42'49''S; 53°44'35''W). This region is one of the main Brazilian pig-producing region. The animals are breed in a production system with good nutritional and sanitary management practices, including the “all-in all-out” management in all pens. All the evaluated pigs were healthy without clinical signs of diarrhea. The sampling consist of fecal samples from nursing piglets ($n=20$), post-weaning pigs ($n=37$), finisher pigs ($n=71$), and breeding animals ($n=41$). After collecting, samples were transported to the laboratory under cold conditions and stored at -70°C until analyses.

RNA extraction

Viral RNA extraction was performed from the supernatant of 20% (wt/vol) fecal suspensions in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 (137mM NaCl; 3mM KCl; 8mM Na_2HPO_4 ; 15mM KH_2PO_4), centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C . Aliquots of 500 μL of supernatants with 50 μL of SDS 10% were homogenized and incubated at 56°C for 20 min. Later, a combination of phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1) and silica / guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods was performed, according to Alfieri et al. (2006). The RNA was eluted from silica pellet in 50 μL of DEPC water (Diethyl pyrocarbonate treated water – Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and kept at -20°C until use. Aliquots of PBS were included as negative control in all RNA extraction

procedures. A PoSaV positive fecal sample, previously identified by genetic sequencing analysis, was used as positive control.

cDNA construction and product amplification

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was performed using the primer pair p289 (reverse; 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3'; nucleotide (nt) 4865–4886) / p290 (forward; 5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3'; nt 4568–4590), designed by Jiang et al. (1999), to amplify a fragment of 331 bp of RdRp gene. After initial denaturation at 97°C for 5 min of 5 µL of extract RNA and 1 µL (20 pmol/µl) of the reverse primer p289 and ultra pure RNase free water, in a final volume of 10 µL, the samples were placed on ice for 5 min. Subsequently, 10 µL of the RT mix solution containing 1xRT buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.3; 3mM MgCl₂; 75mM KCl), 0.1 mM of each dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 mM DTT, 100 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and RNase free water to a final volume of 20 µL was incubated at 42°C for 30 min and enzyme inactivated at 95°C for 5 min.

For the PCR amplification, 8 µL of the cDNA were added to 42 µL of the PCR mix solution containing 1.5xPCR buffer (30mM Tris-HCl pH 8.4; 75mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1 µL (20 pmol/µl) of each primer (p289 reverse / p290 forward), 2.5 units *Platinum Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil) and ultrapure RNase free water in a final volume of 50 µl. The amplification was performed in a thermocycler (PTC 200, MJ Research Co., Water Town, MA, USA) with the following cycling profile: a step of 3 min at 94°C, 40 cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (1 min 20 s at 49°C) and extension (1 min at 72°C), with a final elongation step (10 min at 72°C).

Amplified products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide (0.05 µg/mL) in TBE buffer pH 8.4 (89mM Tris; 89mM boric acid; 2mM EDTA), at constant voltage (100V) for approximately 45 min, and visualized under UV light.

Sequencing and phylogenetic analysis

Seven SaV positive RT-PCR products were selected by the intensity of the band and purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA), quantified in Qubit Fluorometer (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and sequenced with the same primers as used in RT-PCR, in MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequence, Thermo Sequenase II DNA Polymerase and the DYEnamic ET Dye Terminator KIT (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Electropherogram quality analysis of three samples (Fig.1) was performed using Phred and CAP3 softwares (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and the sequences were used if base quality was ≥ 20 . The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST - (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)) was used to search similar sequences deposited in GenBank. Sequence alignment, phylogenetic analysis and the distance were realized in MEGA package software version 4.1 (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega41.html>) using CLUSTAL W version 1.4 and sequence identity matrix was calculated using BioEdit software version 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Phylogenetic trees were constructed based on the neighbor-joining method on the model Kimura 2-parameter, with a bootstrap test of 1000 replicates (Kimura, 1980).

BRA12-PR/09

```
--TTACTCCAAGTGGGACTCCACGCAACATCCGGATGTCACCAGTGCCAGTGTGGAGATCCTTGCAT
CGTATGCAGAGGATCCCCACTAATTCTGCTGCTATAGCCACCCTGTGCGCGCCAGCCAC-TGGAA
GGTTGGATGACATGGGGCTCACCGTCACAACGGGGTTACCATCTGGCATGCCCTTACCAGTGTGA
TCAACTACTTAACCACATGATTTACTTTGCCATGGCCACACTCGAGGCCTATGGCGAGTTTGGTG
TGCCCTATGTTGGGAATGTGTTTCGACAATGAGACCATCTACACCTATGGTGATGATTACATTGTCAA
A
```

BRA22-PR/09

```
--TTACTCCAAGTGGGACTCCACCCTGCACCCGCGTGTGATTGAGGAGGCTGTTGACACACTACTGG
AGTTCGTTGACAACACTGACTTGTGCGTGGCCGTTTCGCAACATCTTGGTCTC-CCGACCACGTGGGC
TGGTTTTTGACATCAGTGTGCCACCTTTAAGGGCCTGCCTTCAGGCATGCCAGGTACCAGCATAA
TAAATTCTGTGTGCCACTTGATCCTGTTTGCATGCAGCGTGTTAGATTGCTATGCTAAGGTGAACGC
ACCTTACCACGGCAACGTGTTCTCCAACGAACGAATAGTAGTTTATGGTGATGATTACATTGTCA--
```

BRA24-PR/09

```
GATTACTCCAAGTGGGACTCCACCCTGCACCCGCGTGTGATTGAGGAGGCTGTTGACACACTACTG
GAGTTCGTTGACAACACTGACTTGTGCGTGGCCGTTTCGCAACATCTTGGTCTC-CCGACCACGTGGG
CTGGTTTTTGACATCAGTGTGCCACCTTTAAGGGCCTGCCTTCAGGCATGCCAGGTACCAGCATA
ATAAATTCTGTGTGCCACTTGATCCTGTTTGCATGCAGCGTGTTAGATTGCTATGCTAAGGTGAAC
GCACCTTACCACGGCAACGTGTTCTCCAAC-----
```

Figure 1 - Nucleotide alignment of the RdRp region of the three porcine SaV strains described in the present study.

ss-PAGE for Rotavirus

Considering a possible co-infection by rotaviruses and sapoviruses (Halaihel et al., 2010; Mijovski et al., 2010) and a cross-reactivity of primer pair p289-p290 (Ludert et al., 2004), all positive samples to sapovirus were also analyzed for groups A, B, and C rotaviruses by ss-PAGE (silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis), carried out according to Herring et al. (1982).

Statistical analysis

SAEG[®] version 9.1 software (www.ufv.br/saeg) was used for detection differences in frequency of sapoviruses in different animal ages, farms, and category. *Chi square* (χ^2) was calculated with *P*-value of ≤ 0.05 as significant difference.

Results and Discussion

Porcine sapovirus detection in commercial pig farms

PoSav was detected in 10 (71.4%) of the pig farms included in this study. All of five breeding herds without growing pigs and five (55.5%) of the growing-pig herds had animals shedding PoSaV in the feces. Similar results were obtained by L'Homme et al. (2009) that detected PoSaV in 75% of the analyzed farms. The RT-PCR assay was positive in 40 (23.7%; CI 17.47-30.80) out of 169 fecal samples evaluated. The rates of positive samples in animal category range from 17.1 to 40.5% (Table 1).

In Brazil, others studies indicate the presence of PoSaV in Brazilian pig farms. Cunha et al. (2010) describe 10% positive samples from Rio de Janeiro State and Barry et al. (2008b) found 30.1% positive samples from different pig farms from five Brazilian states.

Table 1 - Porcine sapovirus frequency by animal category detected by RT-PCR in feces of asymptomatic pigs.

Animal Category	Fecal sample		
	Total	Positive	(%)*
Nursing piglets	20	5	25.0 ^{ab}
Post-weaning pigs	37	15	40.5 ^b
Breeding pigs	41	7	17.1 ^a
Finisher pigs	71	13	18.3 ^a
Total	169	40	23.7

* Different letters indicate significant statistical difference ($P \leq 0.05$; CI 17.47-30.80).

When data was analyzed by animal category, the statistical test showed association between animal group and the presence of sapoviruses ($P \leq 0.05$). Similar prevalence rates were found in finisher pigs and in breeding animals, with low frequency of positive samples; in contrast, it was found a high occurrence of positive fecal samples collected from post-weaning pigs. The statistical difference in *Chi square* test was between post-weaning piglets and adult animals.

The statistical difference between post-weaning piglets and adult animals and the low frequency in nursing piglets compared to post-weaning period can be explained by the lactogenic immunity, which gives protection against sapovirus infection in neonatal piglets, until weaning, when passive antibodies decline (Martínez et al., 2006). Weaning is always a critical phase, and animals are under social and environmental stress.

The frequency of SaV in nursing piglets, lower than in post-weaning animals, agrees with was reported by Halaihel et al. (2010), and is possible justified by the transmission from a calicivirus-shedding sow to its suckling piglets.

Similarly, a low rate observed in older animals suggests that pigs that come into contact with PoSaV, which is relatively resistant in the environment (Duizer et al., 2004), are immunologically protected against reinfections or, otherwise, animals remain with subclinical infection, occurring peaks of virus excretion, perhaps because of immunodepression, promoting virus spread.

Martínez et al. (2006) obtained a similar result, with low prevalence in nursing and older pigs, with higher excretion around 3-4 weeks old. Wang et al. (2006) found 83% of PoSaV positive samples in post-weaning pigs, a result significantly higher than in nursing piglets and adult animals. On the other hand, Mijovski et al. (2010) and Halaihel et al. (2010) found no significant difference in rates of different age groups.

Our study did not show statistical differences on frequencies of detection PoSaV in the 10 positive commercial pig farms ($P>0.05$), but Nakamura et al. (2010) had different results in finishing units, with different frequencies of detection among specifically farms, suggesting that SaV infection rates are influenced by farms sanitary conditions. Certainly disinfection, clean facilities, feces removing and others sanitary cares should prevent sapovirus infections and its spreading in environment.

Group A rotaviruses are reported as one of the main etiological agent of infectious diarrhea in young animals of commercial pig farms. Single and mixed infections with rotavirus groups A, B, and C are also common in diarrheic suckling and recently weaned pigs (Linares et al., 2009; Médici et al., 2011, *in press*). Considering a possible viral co-infection of rotavirus and sapovirus, as described by Halaihel et al. (2010) and Mijovski et al. (2010), all the 40 positive samples to PoSaV were also analyzed for group A, B, and C rotaviruses. None of the ss-PAGE technique evaluated samples was positive to any rotaviruses group, probably because rotavirus infection is most frequently in animals with diarrhea and our sampling were from asymptomatic animals.

Despite others studies show the presence of sapovirus in diarrheic stools, all of our samples were from asymptomatic animals. Mostly of this others studies show no significant differences between diarrheic or non-diarrheic fecal samples, suggesting that sapovirus is not necessarily associated with diarrhea (Cunha et al., 2010; Halaihel et al., 2010) or SaV infections in pigs could cause mild recognizable illness (Mijovski et al., 2010).

Our data corroborate with the idea that PoSaVs may not lead to clinical enteritis in immunocompetent animals and in animals from herd with good nutritional and sanitary management, PoSaV keeps in harmony with the host. When detected in diarrheic fecal samples, probably it is associated with other enteric pathogens, reflecting lower hygienic status in commercial pig farms.

Many studies reveal the presence of porcine sapoviruses from asymptomatic animals. In Slovenia, PoSaVs were detected in 7.1% of samples from five different pig farms (Mijovski et al., 2010). Similar results were found in Hungary (Reuter et al., 2007), Belgium (Mauroy et al., 2008), and Italy (Collins et al., 2009). It is likely that subclinical infection

could help keep virus circulation in pig population and in environment, in addition to render an opportunity for genetic recombination, with changes in pathogenicity during virus replication (Collins et al., 2009).

Porcine sapovirus sequences and phylogenetic analysis based on partial RdRp gene

The seven sequenced RT-PCR amplicons were confirmed as specific for the PoSaV. However, only the sequencing of three products had enough quality to carry out the phylogenetic analyses.

The three PoSaV specific sequences were 271-272 nt long and 91-92 amino acid (aa) long of the RdRp region, being two sequences from nursing piglets and one sequence from post-weaning pig. The classic conserved motif “GLPSG” of RdRp gene was present in all our strains.

Phylogenetic analysis was carried out with representative strains of *Sapovirus* genus, including human SaVs (genogroups GI, GII, GIV, and GV) and PoSaVs of genogroups GIII (Cowden-like), GVI, GVII, and GVIII; in addition, we considered also two potentially new sapovirus genogroups, GIX and GX (Reuter et al., 2010). The analysis divided our sequences into two different genogroups; with one sapovirus strain belonging to the genogroup GIII and two sequences to the proposed genogroup GIX (Fig.2).

The PoSaV genogroup GIII include virus strains of three genotypes. The genotype 1 include SaV strains from Netherlands (PEC IVA116) and the prototype Cowden; the genotype 2 strains from Korea (JB-SC55) and Hungary (Swine-id3); and the genotype 3 strains from USA (QW152) and Netherlands (VA10). For comparison of strains, we compared nt and aa sequence identities of the RNA-polimerase gene between strains used in this study and strains already described. The overall intra-genotype nt identity was 84-92% (95-98% aa), and the highest sequence nt identities between genotypes (intragenogroup) was 84% (94% aa). The porcine BRA12-PR/09 strain, from a breeding herd without growing pigs, clustered in GIII genotype 3 showed nt identity 89-90% (95-98% aa) with QW152 and VA10 strains (Fig.3).

Most of PoSaV is classified as Cowden-like strain, appearing to be the most common PoSaV strain worldwide, including Brazil (Barry et al., 2008a; Collins et al., 2009; Mijovski et al., 2010; Nakamura et al., 2010). One of the explanations for these find is the use of primer pair PEC65/PEC66, which was designed on the basis of GIII SaV RdRp gene. In

opposition, the primer pair p289/p290 used in this study was designed to detect caliciviruses, identifying SaV strains of different genogroups.

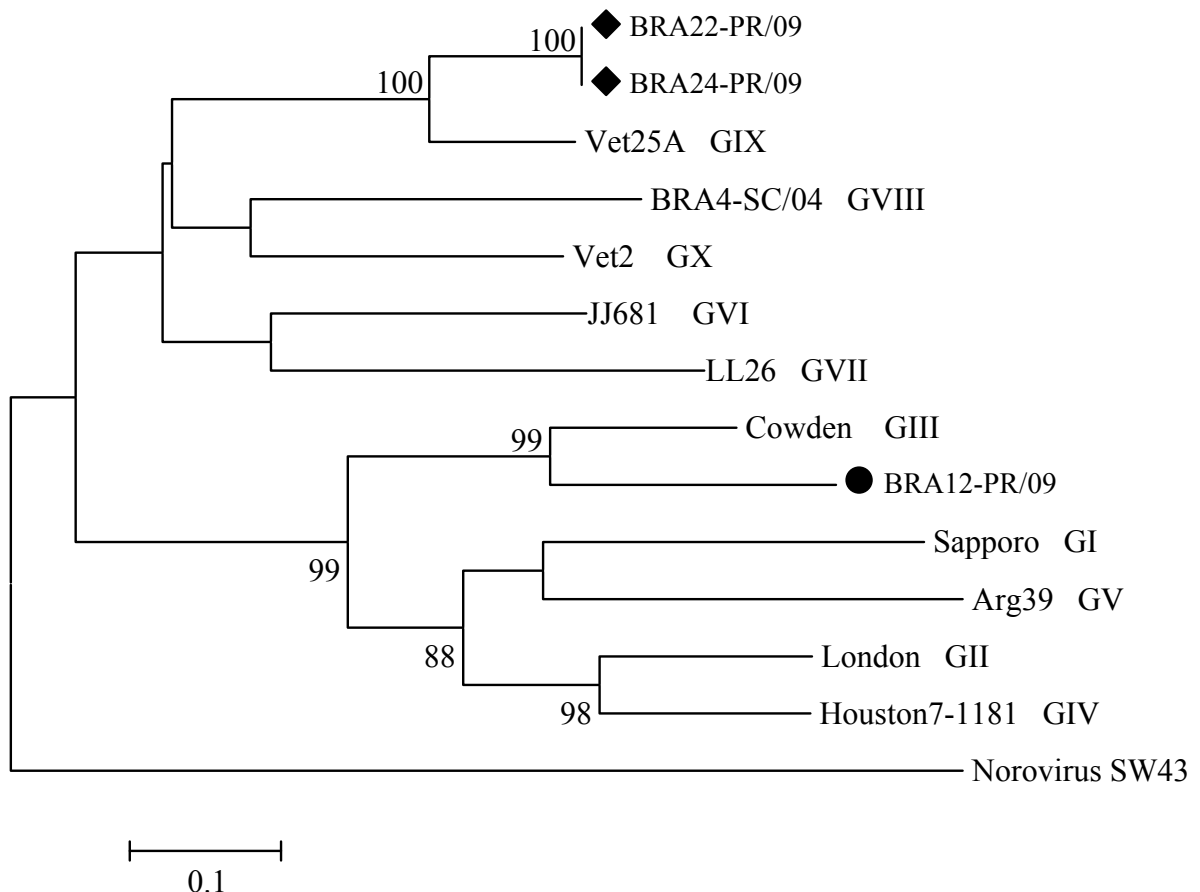


Figura 2 – Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) computed using Kimura 2-parameter based on the partial RdRp gene (272 nt) from published and Brazilian SaV strains. Strains sequenced in this study are indicated. Bootstrap values $\leq 70\%$ were hidden. Accession numbers for the strains used in the analysis are: BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994), Vet25A (FJ854523), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet2 (FJ854508), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), Cowden (AF182760), BRA12-PR/09 (JF297992), Sapporo (U65427), Arg39 (AF405715), London (U95645), Houston7-1181 (AF435811), Norovirus SW43 (AB074892).

Our two others PoSaVs sequences, BRA22-PR/09 and BRA24-PR/09, from another breeding herd without growing pigs, were clustered together, in a well defined group in phylogenetic tree, with a new suggested GIX genogroup, which strains were described, until now, only in Italy and Denmark. Was included in the analysis the Danish (Vet 25-A) strain (Fig. 1). The nt identity between our strains and Vet 25-A strain was 83% (98% aa).

Interestingly, BRA22-PR/09 and BRA24-PR/09 had clonal tendency, with nt and aa identity 100%. They were from the same herd.

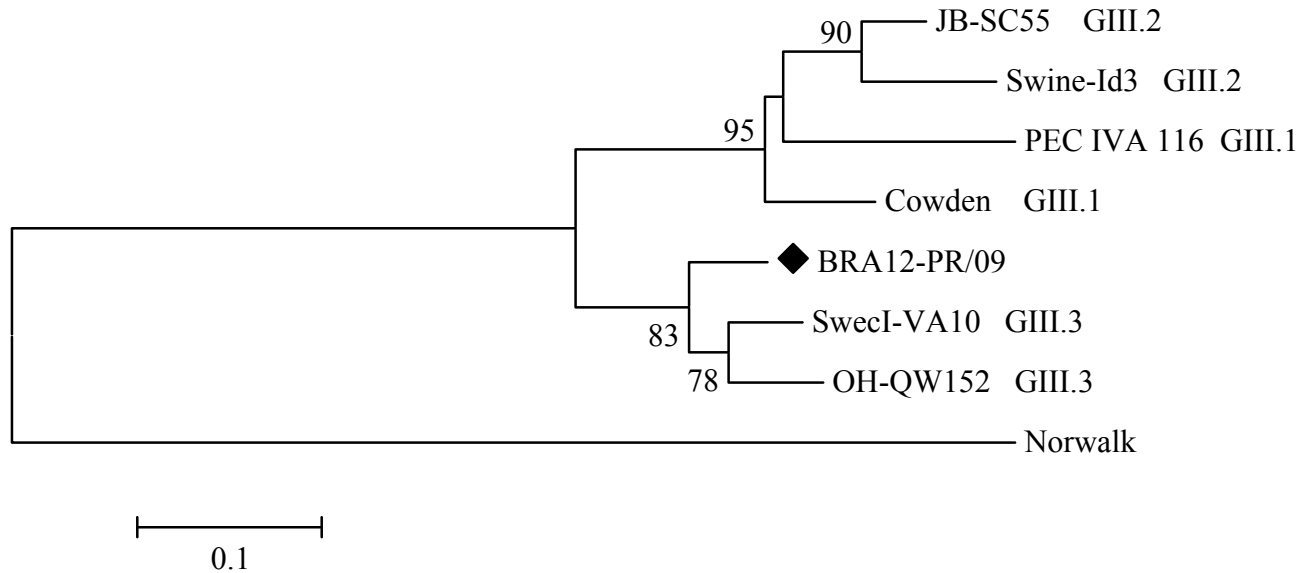


Figura 3 – Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) computed using Kimura 2-parameter based on the partial RdRp gene (305 nt) from published and Brazilian SaV strain. Strain sequenced in this study is indicated. Bootstrap values $\leq 70\%$ were hidden. Accession numbers for the strains used in the analysis are: JB-SC55 (DQ389629), Swine-Id3 (DQ383274), PEC IVA116 (AY615806), Cowden (AF182760), BRA12-PR/09 (JF297992), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), Norwalk (M87661).

Based on that analysis, a new classification of SaV genogroup GIX is credible and, in Brazil, this is the first description of the circulation of this new possible porcine sapovirus genogroup. These results still confirm that exist a high genetic diversity of sapovirus in swine population of Brazil and worldwide.

A possible zoonotic transmission of SaVs is still discussed. Nakamura et al. (2010) detected porcine origin strains that were genetically similar to human SaV genogroup GV, but it is unclear if they originated from porcine or human SaV, despite they possibly emerged from a GV-like SaV as a result of accumulation of genetic mutations. Nevertheless, Bank-Wolf et al. (2010) believe that zoonotic transmission of sapoviruses is a rare event, because infection of humans occurs via contaminated food or water and by direct contact, and animal viruses have not been detected in human stool samples until now. The PoSaV field

strains identified in this study are phylogenetically distant of SaV genogroups described in virus strains of human origin.

In summary, we found porcine sapovirus in feces of asymptomatic animals infecting all age groups, supporting the idea that pigs may be asymptomatic carrier, being PoSaV more frequently in post-weaning pigs than in adult animals. Molecular analysis ratify the presence of porcine genogroup GIII in Brazil, with emphasis on genotype 3, and also reveals, for the first time, the presence of a probable new porcine genogroup GIX in our country, showing the genetic diversity of PoSaV strains in Brazilian pig herds.

References

- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, p. 521-526, 2006.
- ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2010.
- BANK-WOLF, B. R.; KÖNIG, M.; THIEL, H. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 204-212, 2010.
- BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 82-86, 2008a.
- BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 185-191, 2008b.
- COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.; O'SHEA, H. Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms. **Veterinary Microbiology**, v. 39, p. 176-182, 2009.
- CUNHA, J. B.; MENDONÇA, M. C. L.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G. Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1301-1305, 2010.
- DUIZER, E. BIJKERK, P., ROCKX, B.; DE GROOT, A.; TWISK, F.; KOOPMANS, M. Inactivation of caliciviruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4538-4543, 2004.
- GUO, M.; CHANG, K. O.; HARDY, M. E.; ZHANG, Q.; PARWANI, A. V.; SAIF, L. J. Molecular Characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to sapporo-like human caliciviruses. **Journal of Virology**, v. 73, n. 11, p. 9625-9631, 1999.
- GUO, M.; EVERMANN, J. F.; SAIF, L. J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. **Archives of Virology**, v. 146, p. 479-493, 2001.
- HALAIHEL, N.; MASIA, R. M.; FERNÁNDEZ-JIMÉNES, M.; RIBES, J. M.; MONTAVA, R.; BLAS, I. DE; GIRÓNES, O.; ALONSO, J. L.; BUESA, J. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 138, p. 542-548, 2010.
- HANSMAN, G. S.; OKA, T.; KATAYAMA K.; TAKEDA, N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. **Journal of Medical Virology**, v. 17, p. 133-141, 2007.

- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J.D.; Rapid diagnosis of Rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.
- JEONG, C. J.; PARK, S.; PARK, S.; KIM, H.; PARK, S.; JEONG, J.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; KIM, A.; KANG, M.; HYUN, B.; CHO, K. Genetic diversity of porcine sapoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 246-257, 2007.
- JIANG, X.; HUANG, P. W.; ZHONG, W. M.; FARKAS, T.; CUBITT, D. W.; MATSON, D. O. Design and evolution of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 83, p. 145-154, 1999.
- KATAYAMA, K.; MIYOSHI, T.; UCHINO, K.; OKA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, N.; HANSMAN, G. S. Novel recombinant sapovirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1874-1876, 2004.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p.111-120, 1980.
- KITAJIMA, M.; OKA, T.; HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K.; OHGAKI, S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2461-2467, 2010.
- LINARES, R. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A. A. Frequency of group A rotavirus in piglets stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 63-68, 2009.
- L'HOMME, Y.; SANSREGRET, R.; PLANTE-FORTIER, T.; LAMONTAGNE, A.; LACROIX, G.; OUARDANI, M.; DESCHAMPS, J.; SIMARD, G.; SIMARD, C. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005–2007. **Archives of Virology**, v. 154, p. 581-593, 2009.
- LUDERT, J. E.; ALCALÁ, A. C.; LIPRANDI, F. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 835-836, 2004.
- MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A. L.; DECARO, N.; MARI, V.; SAIF, L.; COSTANTINI, V.; GRAZIA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. **Virus Genes**, v. 36, p. 365-373, 2008a.
- MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BANYAYI, K.; DECARO, N.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; RADOGNA, A.; CONSTANTINI, V.; SAIF, L.J.; LAVAZZA, A.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1907-1913, 2008b.

MARTÍNEZ, M. A.; ALCALÁ, A. C.; CARRUYO, G.; BOTERO, L.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p. 77-84, 2006.

MAUROY, A.; SCIPIONI, A.; MATHIJS, E.; MIRY, C.; ZIANT D.; THYS, C.; THIRY, E. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1927-1931, 2008.

MÉDICI, K. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, 2011, *in press*.

MIJOVSKI, J. Z.; POLJŠAK-PRIJATELI, M.; STEYER, A.; BARLIC-MAGANJA, D.; KOREN, S. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 413-420, 2010.

NAKAMURA, K.; SAGA, Y.; IWAI, M.; OBARA, M.; HORIMOTO, E.; HASEGAWA, S.; KURATA, T.; OKUMURA, H.; NAGOSHI, M.; TAKIZAWA, T. Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine sapovirus in Japan during fiscal year 2008. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1215-1222, 2010.

PANG, X.; HONMA, S.; NAKATA, S.; VESIKARI, T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181 (Suppl 2), p. S288–294, 2000.

REUTER, G.; BIRÓ, H.; SZÜES, G.; Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. **Archives of Virology**, v. 152, p. 611-614, 2007.

REUTER, G.; ZIMŠEK-MIJOVSKI, J.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; BARTOLO, I.; RUGGERI, F. M.; KANTALA, T.; MAUNULA, L.; KISS, I.; KECSKEMÉTI, S.; HALAIHEL, N.; BUESA, J.; JOHNSEN, C.; HJULSAGER, C. K.; LARSEN, L. E.; KOOPMANS, M.; BÖTTIGER, B. Incidence, diversity and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 363-368, 2010.

WANG, Q. H.; HAN, M. G.; FUNK, J. A.; BOWMAN, G.; JANIES, D. A.; SAIF, L. J. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5672–5963, 2005.

WANG, Q.; SOUZA, M.; FUNK, J. A.; ZHANG, W.; SAIF, L. J. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2057-2062, 2006.

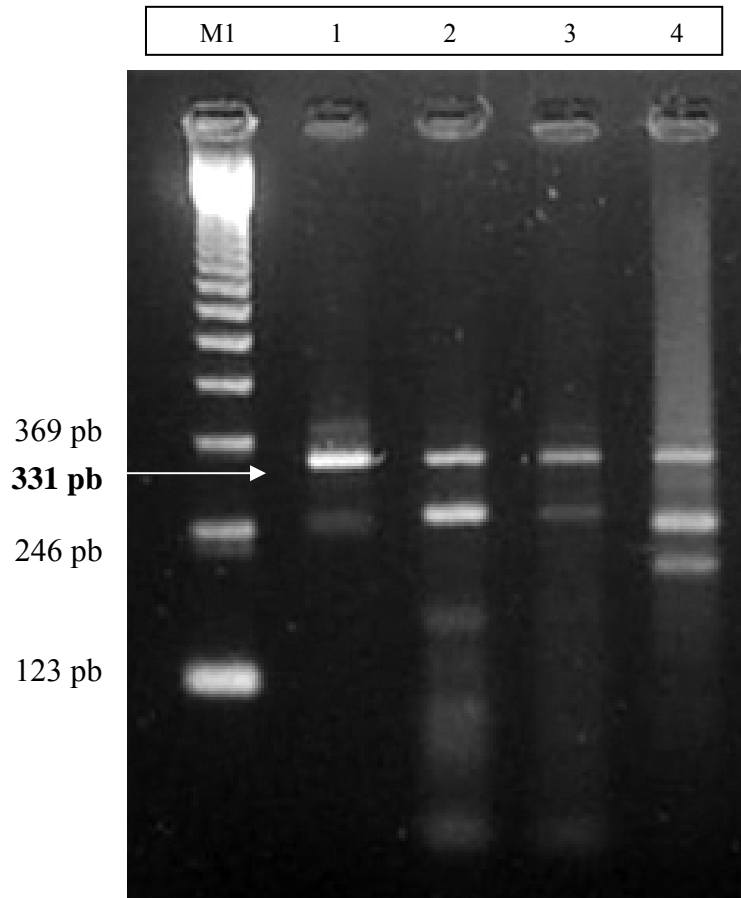
WANG, Q.; COSTANTINI, V.; SAIF, L. J. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5453-5466, 2007.

4 CONCLUSÕES

- O PoSaV pode ser detectado em média frequência em fezes de suínos assintomáticos;
- A infecção pelo PoSaV encontra-se amplamente disseminada na região e rebanhos suínolas avaliados;
- A infecção intra-rebanho pelo PoSaV pode ocorrer em todas as faixas etárias de suínos porém, com maior frequência, em animais recentemente desmamados;
- Os resultados desse estudo ratificam trabalhos anteriores que identificaram diversidade molecular nas estirpes virais de PoSaV circulantes no Brasil.

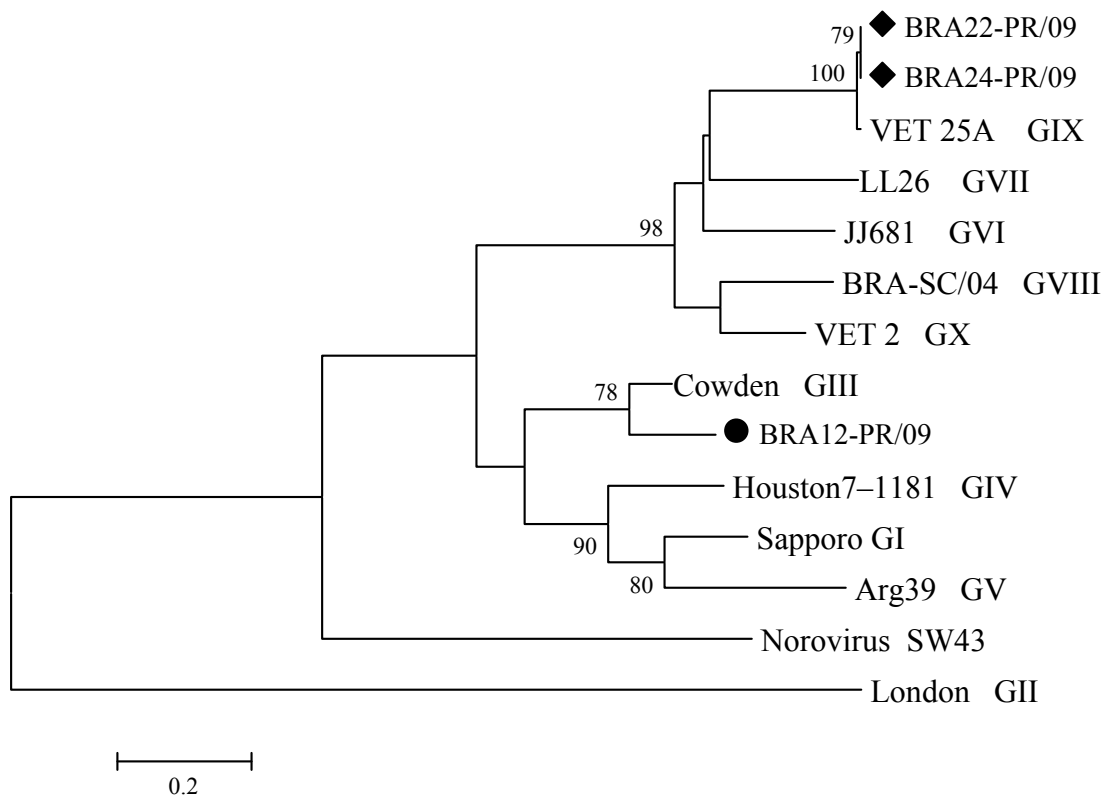
APÊNDICES

APÊNDICE A



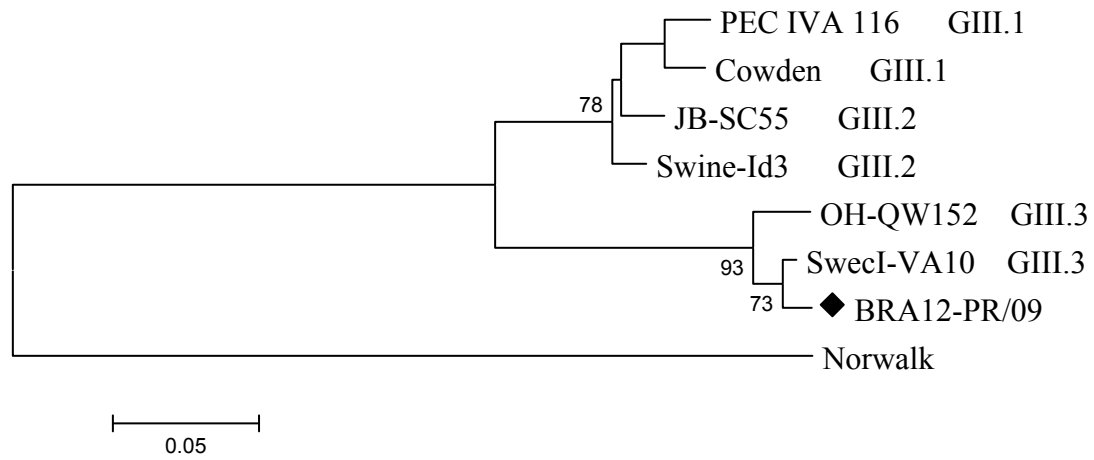
Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo dos fragmentos de 331 pb (seta) dos produtos de RT-PCR, que amplificam parcialmente o gene da polimerase viral do sapovírus suíno, presente em amostras fecais de suínos. Canaletas: M1 (marcador de tamanho molecular de 123 pb); 1 (controle positivo); 2 - 4 (amostras fecais positivas).

APÊNDICE B



Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada na sequência de 92 aa do gene que codifica a RdRp das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, inclusive das estirpes descritas neste estudo. Reconstrução em *Poisson correction*, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994), Vet25A (FJ854523), LL26 (AY974195), JJ681 (AY974192), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet2 (FJ854508), Cowden (AF182760), BRA12-PR/09 (JF297992), Houston7-1181 (AF435811), Sapporo (U65427), Arg39 (AF405715), Norovirus SW43 (AB074892), London (U95645).

APÊNDICE C



Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada na sequência de 96 aa do gene que codifica a RdRp das estirpes do gênero *Sapovirus* genogrupo III, incluindo a estirpe descrita neste estudo. Reconstrução em *Poisson correction*, com valores de *bootstrap* em % (1000 replicações). Sequências obtidas no *GenBank* com os seguintes códigos de acesso: PEC IVA116 (AY615806), Cowden (AF182760), JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), OH-QW152 (AY826425), SwecI-VA10 (AY615807), BRA12-PR/09 (JF297992), Norwalk (M87661).

APÊNDICE D

Seq->	Sapporo	London	Cowden	Houston7-1181	Arg39	JJ681	LL26	BRA4-SC/04	Vet25A	Vet2	Norovirus SW 43	BRA12-PR/09	BRA22-PR/09	BRA24-PR/09
Sapporo	ID	0,642	0,553	0,634	0,619	0,49	0,452	0,476	0,426	0,501	0,363	0,516	0,422	0,422
London	0,642	ID	0,59	0,771	0,59	0,509	0,466	0,49	0,455	0,527	0,404	0,571	0,459	0,459
Cowden	0,553	0,59	ID	0,586	0,579	0,531	0,481	0,509	0,533	0,516	0,415	0,76	0,507	0,507
Houston7-1181	0,634	0,771	0,586	ID	0,553	0,523	0,466	0,509	0,474	0,538	0,397	0,579	0,474	0,474
Arg39	0,619	0,59	0,579	0,553	ID	0,457	0,444	0,453	0,441	0,472	0,36	0,579	0,433	0,433
JJ681	0,49	0,509	0,531	0,523	0,457	ID	0,643	0,605	0,584	0,612	0,419	0,527	0,588	0,588
LL26	0,452	0,466	0,481	0,466	0,444	0,643	ID	0,54	0,61	0,544	0,4	0,485	0,602	0,602
BRA4-SC/04	0,476	0,49	0,509	0,509	0,453	0,605	0,54	ID	0,588	0,664	0,411	0,483	0,58	0,58
Vet25A	0,426	0,455	0,533	0,474	0,441	0,584	0,61	0,588	ID	0,61	0,441	0,455	0,833	0,833
Vet2	0,501	0,527	0,516	0,538	0,472	0,612	0,544	0,664	0,61	ID	0,433	0,516	0,613	0,613
Norovirus SW 43	0,363	0,404	0,415	0,397	0,36	0,419	0,4	0,411	0,441	0,433	ID	0,393	0,455	0,455
BRA12-PR/09	0,516	0,571	0,76	0,579	0,579	0,527	0,485	0,483	0,455	0,516	0,393	ID	0,47	0,47
BRA22-PR/09	0,422	0,459	0,507	0,474	0,433	0,588	0,602	0,58	0,833	0,613	0,455	0,47	ID	1
BRA24-PR/09	0,422	0,459	0,507	0,474	0,433	0,588	0,602	0,58	0,833	0,613	0,455	0,47	1	ID

Tabela de similaridade baseada em um fragmento de 272 nt do gene da polimerase viral das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, inclusive das estirpes descritas neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Sapporo (U65427), London (U95645), Cowden (AF182760), Houston7-1181 (AF435811), Arg39 (AF405715), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet25A (FJ854523), Vet2 (FJ854508), Norovirus SW43 (AB074892), BRA12-PR/09 (JF297992), BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994).

APÊNDICE E

Seq->	Norovirus SW43	Sapporo	London	Cowden	Houston7-1181	Arg 39	JJ681	LL26	BRA SC 04 GVIII	VET 25A	VET 2	BRA12-PR/09	BRA22-PR/09	BRA24-PR/09
Norovirus SW43	ID	0,255	0,086	0,244	0,233	0,288	0,233	0,233	0,288	0,222	0,266	0,244	0,222	0,222
Sapporo	0,255	ID	0,086	0,588	0,7	0,666	0,411	0,411	0,422	0,377	0,411	0,544	0,377	0,377
London	0,086	0,086	ID	0,108	0,086	0,076	0,076	0,086	0,076	0,065	0,065	0,13	0,065	0,065
Cowden	0,244	0,588	0,108	ID	0,577	0,5	0,455	0,422	0,433	0,433	0,444	0,822	0,433	0,433
Houston7-1181	0,233	0,7	0,086	0,577	ID	0,577	0,433	0,4	0,411	0,411	0,433	0,555	0,411	0,411
Arg 39	0,288	0,666	0,076	0,5	0,577	ID	0,333	0,366	0,355	0,311	0,344	0,522	0,311	0,311
JJ681	0,233	0,411	0,076	0,455	0,433	0,333	ID	0,666	0,6	0,644	0,666	0,422	0,644	0,644
LL26	0,233	0,411	0,086	0,422	0,4	0,366	0,666	ID	0,588	0,633	0,577	0,422	0,633	0,633
BRA SC 04	0,288	0,422	0,076	0,433	0,411	0,355	0,6	0,588	ID	0,6	0,744	0,4	0,6	0,6
VET 25A	0,222	0,377	0,065	0,433	0,411	0,311	0,644	0,633	0,6	ID	0,688	0,388	0,988	0,988
VET 2	0,266	0,411	0,065	0,444	0,433	0,344	0,666	0,577	0,744	0,688	ID	0,411	0,688	0,688
BRA12-PR/09	0,244	0,544	0,13	0,822	0,555	0,522	0,422	0,422	0,4	0,388	0,411	ID	0,388	0,388
BRA22-PR/09	0,222	0,377	0,065	0,433	0,411	0,311	0,644	0,633	0,6	0,988	0,688	0,388	ID	1
BRA24-PR/09	0,222	0,377	0,065	0,433	0,411	0,311	0,644	0,633	0,6	0,988	0,688	0,388	1	ID

Tabela de similaridade baseada em um fragmento de 92 aa do gene da polimerase viral das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, inclusive das estirpes descritas neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Norovirus SW43 (AB074893), Sapporo (U65427), London (U95645), Cowden (AF182760), Houston7-1181 (AF435811), Arg39 (AF405715), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet25A (FJ854523), Vet2 (FJ854508), BRA12-PR/09 (JF297992), BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994).

APÊNDICE F

Seq->	Cowden GIII.1	PEC IVA116 GIII.1	JB-SC55 GIII.2	Swine-Id3 GIII.2	Swec-VA10 GIII.3	OH-QW152 GIII.3	Norwalk	BRA12-PR/09
Cowden GIII.1	ID	0,846	0,842	0,832	0,762	0,758	0,419	0,765
PEC IVA116 GIII.1	0,846	ID	0,8	0,811	0,702	0,72	0,406	0,72
JB-SC55 GIII.2	0,842	0,8	ID	0,902	0,758	0,751	0,413	0,755
Swine-Id3 GIII.2	0,832	0,811	0,902	ID	0,741	0,73	0,393	0,72
SwecI-VA10 GIII.3	0,762	0,702	0,758	0,741	ID	0,912	0,422	0,902
OH-QW152 GIII.3	0,758	0,72	0,751	0,73	0,912	ID	0,419	0,895
Norwalk	0,419	0,406	0,413	0,393	0,422	0,419	ID	0,436
BRA12-PR/09	0,765	0,72	0,755	0,72	0,902	0,895	0,436	ID

Tabela de similaridade baseada em um fragmento de 305 nt do gene da polimerase viral das estirpes do gênero *Sapovirus* genogrupo III, inclusive da estirpe descrita neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Cowden (AF182760), PEC IVA116 (AY615806), JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), BRA12-PR/09 (JF297992), Norwalk (M87661).

APÊNDICE G

Seq->	PEC IVA 116 GIII.1	Cowden GIII.1	JB-SC55 GIII.2	Swine-Id3 GIII.2	Swec-VA10 GIII.3	OH-QW 152 GIII.3	BRA12-PR/09	Norwalk
PEC IVA 116 GIII.1	ID	0,968	0,947	0,957	0,821	0,8	0,821	0,062
Cowden GIII.1	0,968	ID	0,936	0,947	0,831	0,81	0,831	0,062
JB-SC55 GIII.2	0,947	0,936	ID	0,968	0,852	0,831	0,852	0,062
Swine-Id3 GIII.2	0,957	0,947	0,968	ID	0,863	0,842	0,852	0,062
SwecI-VA10 GIII.3	0,821	0,831	0,852	0,863	ID	0,968	0,989	0,072
OH-QW 152 GIII.3	0,8	0,81	0,831	0,842	0,968	ID	0,957	0,072
BRA12-PR/09	0,821	0,831	0,852	0,852	0,989	0,957	ID	0,072
Norwalk	0,062	0,062	0,062	0,062	0,072	0,072	0,072	ID

Tabela de similaridade baseada em um fragmento de 96 aa do gene da polimerase viral das estirpes do gênero *Sapovirus* genogruppo III, inclusive da estirpe descrita neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): PEC IVA116 (AY615806), Cowden (AF182760), JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), BRA12-PR/09 (JF297992), Norwalk (M87661).

APÊNDICE H

Sapporo	Sapporo	London	Cowden	Houston7-1181	Arg39	JJ681	LL26	BRA4-SC/04	Vet25A	Vet2	Norovirus SW43	BRA12-PR/09	BRA22-PR/09
London	0,475												
Cowden	0,676	0,595											
Houston7-1181	0,494	0,280	0,604										
Arg39	0,530	0,573	0,594	0,649									
JJ681	0,834	0,780	0,746	0,757	0,924								
LL26	0,976	0,913	0,887	0,924	0,980	0,495							
BRA4-SC/04	0,859	0,869	0,787	0,801	0,944	0,551	0,682						
Vet25A	1,024	0,939	0,719	0,875	0,965	0,623	0,561	0,569					
Vet2	0,787	0,738	0,784	0,730	0,857	0,548	0,676	0,465	0,528				
Norovirus SW43	1,291	1,136	1,042	1,177	1,308	1,047	1,101	1,093	0,968	0,991			
BRA12-PR/09	0,787	0,642	0,312	0,626	0,598	0,761	0,875	0,911	0,991	0,776	1,191		
BRA22-PR/09	1,044	0,938	0,804	0,889	0,996	0,605	0,572	0,596	0,197	0,520	0,900	0,944	
BRA24-PR/09	1,044	0,938	0,804	0,889	0,996	0,605	0,572	0,596	0,197	0,520	0,900	0,944	0,000

Distância de nucleotídeos (272 nt) das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, inclusive das estirpes descritas neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Sapporo (U65427), London (U95645), Cowden (AF182760), Houston7-1181 (AF435811), Arg39 (AF405715), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet25A (FJ854523), Vet2 (FJ854508), Norovirus SW43 (AB074892), BRA12-PR/09 (JF297992), BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994).

APÊNDICE I

Norovirus SW43	Norovirus SW43	Sapporo	London	Cowden	Houston-7-1181	Arg39	JJ681	LL26	BRA-SC/04	VET 25A	VET 2	BRA-PR/09	BRA22-PR/09
Sapporo	1,319												
London	2,375	2,375											
Cowden	1,363	0,542	2,152										
Houston-7-1181	1,410	0,343	2,375	0,542									
Arg39	1,196	0,394	2,508	0,693	0,563								
JJ681	1,410	0,928	2,508	0,817	0,871	1,159							
LL26	1,410	0,928	2,375	0,899	0,958	1,053	0,429						
BRA-SC/04	1,196	0,899	2,508	0,843	0,899	1,053	0,503	0,523					
VET 25A	1,459	1,020	2,663	0,843	0,928	1,196	0,429	0,447	0,523				
VET 2	1,276	0,928	2,663	0,817	0,871	1,087	0,394	0,542	0,295	0,394			
BRA12-PR/09	1,363	0,626	1,969	0,192	0,604	0,670	0,928	0,928	0,928	0,958	0,899		
BRA22-PR/09	1,459	1,020	2,663	0,843	0,928	1,196	0,429	0,447	0,523	0,012	0,394	0,958	
BRA24-PR/09	1,459	1,020	2,663	0,843	0,928	1,196	0,429	0,447	0,523	0,012	0,394	0,958	0,000

Distância de aminoácidos (92 aa) das principais estirpes do gênero *Sapovirus*, inclusive das estirpes descritas neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Sapporo (U65427), London (U95645), Cowden (AF182760), Houston7-1181 (AF435811), Arg39 (AF405715), JJ681 (AY974192), LL26 (AY974195), BRA4-SC/04 (EF183478), Vet25A (FJ854523), Vet2 (FJ854508), Norovirus SW43 (AB074892), BRA12-PR/09 (JF297992), BRA22-PR/09 (JF297993), BRA24-PR/09 (JF297994).

APÊNDICE J

Cowden	Cowden	PEC IVA116	JB-SC55	Swine-Id3	Swec-VA10	OH-QW 152	Norwalk
PEC IVA116	0,182						
JB-SC55	0,172	0,229					
Swine-Id3	0,188	0,216	0,108				
SwecI-VA10	0,282	0,382	0,292	0,320			
OH-QW 152	0,292	0,356	0,302	0,336	0,092		
Norwalk	1,005	1,081	1,028	1,134	0,978	0,996	
BRA12-PR/09	0,283	0,360	0,298	0,358	0,103	0,116	0,938

Distância de nucleotídeos (305 nt) das estirpes do gênero *Sapovirus* genogrupo III, inclusive da estirpe descrita neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Cowden (AF182760), PEC IVA116 (AY615806), JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), BRA12-PR/09 (JF297992), Norwalk (M87661).

APÊNDICE K

PEC IVA 116	PEC IVA 116	Cowden	JB-SC55	Swine-Id3	Swec-VA10	OH-QW152	BRA12-PR/09
Cowden	0,032						
JB-SC55	0,054	0,065					
Swine-Id3	0,043	0,054	0,032				
SwecI-VA10	0,197	0,184	0,159	0,147			
OH-QW152	0,223	0,210	0,184	0,172	0,032		
BRA12-PR/09	0,197	0,184	0,159	0,159	0,011	0,043	
Norwalk	2,762	2,762	2,762	2,762	2,608	2,608	2,608

Distância de aminoácidos (96 aa) das estirpes do gênero *Sapovirus* genogrupo III, inclusive da estirpe descrita neste estudo. Número de acesso (*GenBank*): Cowden (AF182760), PEC IVA116 (AY615806), JB-SC55 (DQ389628), Swine-Id3 (DQ383274), SwecI-VA10 (AY615807), OH-QW152 (AY826425), BRA12-PR/09 (JF297992), Norwalk (M87661).

ANEXOS

ANEXO A
Lista de Reagentes

1. 2-Mercaptoetanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka[®])
2. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
3. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
4. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
6. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
7. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL[®])
8. Agarose (Gibco BRL[®])
9. Água DEPEC (Dietil pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
10. Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
11. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (Synth[®])
12. Azul de bromofenol (Sigma[®])
13. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma[®])
14. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma[®])
15. Brometo de etídeo ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
16. Cloreto de magnésio 50 mM ($MgCl_2$) (Invitrogen Life Technologies[®])
17. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
18. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
19. Clorofórmio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
20. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
21. Dithiothreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies[™])
22. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
23. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μ L; 25 μ mol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
24. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth[®])
25. Fenol (C_6H_5OH) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
26. Fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
27. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])

28. Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear[®])
29. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
30. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
31. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
32. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
33. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/μL (Invitrogen Life Technologies[®])
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) p290 (forward; 5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC -3'; nt 4568–4590) Jiang et al. (1999) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) p289 (reverse; 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA -3'; nucleotide (nt) 4865–4886) Jiang et al. (1999) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
36. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
37. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])
38. RT-Buffer (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
39. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
40. Triton x-100

ANEXO B
Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

- *Primer p290 forward*

Sequência: 5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3'

Posição: 4568–4590

Concentração: 20,22 nmol

Data de fabricação: maio.2010

$$20,22 \times 1000 = 20220 \text{ pmol}$$

$$20220 / 20 = 101,10$$

Solução estoque: ressuspender em 101,10 μ l de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

Solução de uso: diluir 1:10 a solução estoque em água MilliQ

Concentração final: 20 pmol/ μ l

- *Primer p289 reverse*

Sequência: 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3';

Posição: 4865–4886

Concentração: 18,24 nmol

Data de fabricação: maio.2010

$$18,24 \times 1000 = 18240 \text{ pmol}$$

$$18240 / 20 = 91,2$$

Solução estoque: ressuspender em 91,2 μ l de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

Solução de uso: diluir 1:10 a solução estoque em água MilliQ

Concentração final: 20 pmol/ μ l

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

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

- **Lower TRIS pH 8,8 para PAGE**
 - 36,34 g TRIS (1,5M)
 - água bidestilada q.s.p. 200 mL

- **Gel de agarose 2%**
 - 1 g agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 20 μ L de brometo de etídio

- **Gel inferior (7,5%) da PAGE**
 - 5 mL Lower TRIS
 - 3 mL acrilamida/Bisacrilamida
 - 50 μ L TEMED
 - 0,56 mL persulfato de amônio 2%
 - 11,44 mL água bidestilada

- **Gel superior (3,5%) da PAGE**

- 2,5 mL Upper TRIS
- 0,7 mL acrilamida/bisacrilamida
- 50 μ L TEMED
- 0,60 mL persulfato de amônio 2%
- 6,20 mL água bidestilada

- **SDS 10%**
 - 5 g 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 100
 - água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
 - 1,3 g bisacrilamida
 - 50 g acrilamida
 - água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Solução fixadora para PAGE**
 - 30 mL álcool etílico absoluto
 - 1,5 mL ácido acético
 - água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução de prata para PAGE**
 - 0,55 g de nitrato de prata

- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução reveladora para PAGE**
 - 9 g hidróxido de sódio
 - 2,5 mL formaldeído
 - 0,06 g borohidreto de sódio
 - água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução stop da coloração para PAGE**
 - 15 mL ácido acético P.A.
 - água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução conservadora para PAGE**
 - 15 mL álcool etílico P.A.
 - água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**
 - 0,25 g azul de bromofenol 0,25%
 - 45 g sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%
 - água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**
 - 0,2 mL azul de bromofenol 1%
 - 6,0 mL SDS 10%
 - 1 mL 2-mercaptoetanol
 - 2,5 mL TRIS-HCl 0,5M
 - 6 g uréia
 - água bidestilada q.s.p. 20 mL

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x[]**
 - 107,78 g Tris 0,89 M
 - 55,03 g ácido bórico 0,89 M
 - 7,45 g EDTA 0,02 M

- água bidestilada q.s.p. 1 litro

pH 8,4

- **Tampão de corrida para PAGE**

- 30 g TRIS 0,24M

- 14,4 g ácido aminoacético (glicina) ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) 0,19M

- água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **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 DEPEC q.s.p. 500 mL

pH 7,2

- **Upper TRIS pH 6,8 para PAGE**

- 12,12 g TRIS (0,5M)

- água bidestilada q.s.p. 200 mL

ANEXO C

Protocolo de Técnicas

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

1. Suspensão fecal – extração bruta

100 μ L ou 100 mg de fezes

500 μ L de PBS

Homogeneizar em vórtex

Centrifugar a 500 G / 5 min

Utilizar 500 μ L do sobrenadante para extração

2. Extração do RNA

Fase I – Fenol

Adicionar 50 μ L de SDS 10%

Homogeneizar em vórtex

Banho-maria à 56°C / 20 min

Spin (centrifugar a 10.000 G durante 30 s)

Adicionar 400 μ L de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico

Homogeneizar em vórtex

Banho-maria à 56°C / 15 min

Homogeneizar manualmente

Centrifugar a 10.000 G durante 10 min

Recolher sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

Adicionar 500 μ L de solução L6

Adicionar 25 μ L de sílica hidratada

Homogeneizar em vórtex

Agitar durante 30 min em temperatura ambiente

Spin

Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

Adicionar 500 µL de solução L2

Homogeneizar em vórtex

Spin

Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

Repetir 1x os quatro últimos passos

Adicionar 1 mL de etanol a 70%

Homogeneizar em vórtex

Spin

Desprezar sobrenadante

Repetir 1x os quatro últimos passos

Adicionar 1 mL de acetona PA

Homogeneizar em vórtex

Spin

Desprezar sobrenadante

Secar o sedimento em termo bloco a 60° C aproximadamente por 2 min

Adicionar 50 µL de água DEPC

Homogeneizar em vórtex

Banho-maria à 56° C durante 15 min

Homogeneizar em vórtex

Centrifugar a 10.000 G durante 4 min

Recolher sobrenadante em microtubo de 500 µL

Estocar a 4°C até a utilização

- **Oligonucleotídeos iniciadores - *Primers***

P289 (*reverse*): **5'** TGACAATGTAATCATCACCATA **3'**

P290 (*forward*): **5'** GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC **3'**

Fragmento esperado: SaV 331 pb

- **RT-MIX (para uma reação)**

Buffer 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8.3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4,0 µL

DTT (0,1 M): 2,0 µL

dNTP (0,1 mM): 1,0 µL

M-MLV (200 U/µL): 0,5 µL

Água: 2,5 µL

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 7,5 µL

MgCl₂ (50 mM): 2,0 µL

dNTP (0,1 mM): 4,0 µL

p289 (20 pmol): 1,0 µL

p290 (20 pmol): 1,0 µL

Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/µL): 0,5 µL

Água: 26,0 µL

- **RT-PCR**

5 µL RNA extraído

1 µL *primer* p289 (*reverse*)

4 µL água MilliQ autoclavada

97°C / 5 min

5 min banho de gelo

Adicionar 10 µL RT MIX

42°C / 30 min

95°C / 5 min

Manter a 4°C

cDNA

8 μ L cDNA

42 μ L PCR MIX

50 μ L de volume final

94°C / 3 min

40 ciclos (94°C / 30 s; 49°C / 1 min 20 s; 72°C / 1 min)

72°C / 10 min

Manter a 4°C

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose

- 50 mL TBE *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8.4

- 30 μ L de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL)

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

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

Adicionar 10 μ L do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de Del

Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min

Spin

Transferir 600 μ L da amostra com o *Capture buffer type 2* em um microtubo coletor com coluna

Incubar a temperatura ambiente por 1 min

Centrifugar a 13 000 G / 2 min

Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo microtubo

Adicionar 500 μ L do *Wash buufer type 1* na coluna com microtubo coletor

Centrifugar a 13 000 G / 1 min

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

Adicionar 30 μL do *Elution buffer type 6*

Incubar a temperatura ambiente por 1 min

Centrifugar a 13 000 G / 1 min

Estocar o DNA purificado em -20°C

- **Quantificação de produto de PCR**

Preparar a solução *Quant-iTTM Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iTTM* no *Quant-iTTM Buffer*, 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.

Homogeneizar em vortex

No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution 2* a 2 μL do DNA purificado

No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0

No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100

Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2 – 3 s

Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min

Realizar a leitura utilizando *QubitTM fluorometer* (Invitrogen Life TechnologiesTM)

Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

ANEXO D
Lista de Software

- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007

(www.ufv.br/saeg)

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3

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

- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool

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

- MEGA package software version 4.1

(<http://www.megasoftware.net/mega4/mega41.html>)

- BioEdit software version 7.0.9.0

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