

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIANA BRAGAZZI CUNHA

Detecção e caracterização molecular de calicivírus entéricos em suínos de rebanhos do Estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Virologia

Orientadores:

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

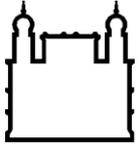
RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: JULIANA BRAGAZZI CUNHA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CALICIVÍRUS ENTÉRICOS
EM SUÍNOS DE REBANHOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ORIENTADORES:

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Alves Pinto – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz – Presidente

Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso – Universidade Federal de Goiás

Dr. Marcelo de Lima – Universidade Federal Fluminense

SUPLENTE:

Dra. Caroline Cordeiro Soares – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Dr. Renato Sergio Marchevsky – Biomanguinhos/Fiocruz – revisor

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz sob orientação do Dr. José Paulo Gagliardi Leite e da Dra. Marize Pereira Miagostovich.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, por ter me aceitado de volta ao laboratório depois de alguns anos fora. Não conseguirei descrever em palavras a felicidade que tive quando soube que ele me orientaria no Mestrado. Agradeço por tudo que me ensinou, na parte profissional e pessoal. Para mim, é uma pessoa em quem me espelhar profissionalmente, pois se dedica de forma impressionante à pesquisa e parece nunca perder o interesse por ela. Com certeza o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) tem grande parcela de “culpa” no fato de ter escolhido a virologia para dedicar minha vida profissional.

- À Dra. Marize Pereira Miagostovich, por ter aceitado me orientar sem me conhecer muito bem, por sempre estar disposta a ajudar, pela presença e disponibilidade de tempo constante. Agradeço por responder minhas dúvidas, ouvir minhas inseguranças relacionadas ao trabalho, mas, também, pelos momentos de descontração. Tem uma forma de lidar com situações adversas extremamente prática e objetiva, algo que tento aprender com ela.

- Aos funcionários atuais e passados do LVCA: Gilmar Alcântara, Rosane Assis, Mônica Rocha, Maria da Penha Xavier, Juliana Andrade, Silvana Portes, Elioneide dos Santos, Marilda Almeida. Agradeço pelas muitas ideias trocadas, dicas dadas e risadas.

- A Alexandre Madi Fialho, pelas boas conversas na paz da Fiocruz antes das oito horas da manhã, por querer sempre ensinar nos mínimos detalhes, por ser de grande presteza. Agradeço pelo que me ensinou quando era estagiária, pelo que me ensina agora e também por ter feito os géis para mim. Sem ele, eu não terminaria o trabalho a tempo.

- A Francisca dos Santos, pessoa maravilhosa, de enorme integridade, batalhadora, positiva, um exemplo a ser seguido. Agradeço pelas conversas carinhosas, por me ouvir sempre com boa vontade, por dar um pouco de seu tempo para cada um do laboratório.

- Ao Dr. Eduardo de Mello Volotão, por sempre estar disposto a ajudar, mesmo quando isso o incomodava em seu trabalho, por todas as observações realizadas, ensinamentos passados, e o melhor, os pontos de vista tão diferentes do que normalmente as pessoas têm. Agradeço pela amizade.

- Ao Dr. Marcos César Lima de Mendonça, por tudo que me ensinou, pela companhia nos trabalhos de final de semana, pela companhia nas músicas cantadas, pelas risadas, pelo apoio, por sempre ajudar todos do laboratório. O LVCA perderá um grande pesquisador.

- À querida Marcelle Figueira Marques, tenho tanto a agradecê-la. Desde antes de nos conhecermos, quando ainda éramos concorrentes da vaga no Mestrado, sempre esteve disposta a ajudar. Com o tempo, passou a ser uma grande amiga. É uma pessoa de grande valor, enorme sensibilidade e senso de humor cortante, é ótimo tê-la por perto.

- Às queridas Carmen Vieira e Flávia Guimarães, pessoas que vale a pena conhecer e ter por perto.

- Às minhas colegas de sala: Ludmila Rocha, Thais Ramos e Julia Fioretti. Agradeço pela amizade, por aturar meus momentos (talvez mais que momentos) de mau humor e pelo companheirismo.

- À Profa. Ana Pinto, pela amizade já de alguns anos, por ter sempre algo a ensinar e por ter sempre uma palavra amiga.

- A Ana Carolina Ganime, que caiu de “pára-quadras” no laboratório e só tornou o ambiente melhor. Agradeço pela energia positiva tão contagiante e calma constante, foi ótimo conhecê-la.
- Aos companheiros de laboratório Alexandre Pina, Joeler Vargas, Edson Pereira, Tatiana de Rose, Suellem Possas, Irene Araújo, Tulio Fumian, pelos momentos alegres dentro e fora do laboratório.
- Aos queridos uruguaios e uruguaia: Matías Victoria, Luis Fernando López e Mariela Martínez, pessoas admiráveis pela dedicação ao trabalho, pela personalidade e pelo companheirismo absoluto. Tive grande sorte de conhecê-los.
- A Débora Regina Lopes Santos, por tantas coisas... Por me indicar a primeira suinocultura que conseguimos realizar coletas, pela amizade dentro e fora da Fundação, pelos comentários hilários, pela sensibilidade, por dividir os mesmos problemas de quem trabalha com suínos, enfim, por ser tão amiga e divertida.
- A Anna Carolina Mendes e Tamara Fogel, pela diversão garantida em sua companhia.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, em especial, à secretária Daniele Lobato.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.
- Aos doutores Caroline Cordeiro Soares, Divina das Dôres de Paula Cardoso, Marcelo Alves Pinto, Marcelo de Lima e Renato Sergio Marchevsky por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação.
- Ao Dr. Renato Sergio Marchevsky pelo trabalho de revisão.
- À Dra. Mariana de Andrea Vilas-Boas Hacker, pela ajuda com análise estatística.
- Ao Prof. Diogo Almeida, da Faculdade de Veterinária – UFF, pela indicação de fazendas.
- Aos proprietários e funcionários das suinoculturas que participaram deste estudo, sem eles nada teria sido possível.
- Ao setor de transporte da Fiocruz, por possibilitar o acesso às propriedades.
- A meus pais, por nunca interferirem e sempre apoiarem todas minhas decisões profissionais. Sem seu apoio não teria conseguido sequer passar no concurso do Pedro II, quem diria terminar um mestrado na Fundação Oswaldo Cruz?! Agradeço por aturarem minha personalidade difícil, por respeitarem as horas isoladas no meu quarto para finalizar este trabalho. Obrigada por tudo!
- À minha irmã Bia, pela amizade, apoio, estímulo, compreensão, e agora, por trazer o Bernardo ao mundo, o mais novo integrante da família. Agradeço por ser minha melhor amiga.
- Ao meu cunhado Max, por sempre estar de bom humor, por ser tão divertido, e por também ser responsável pela chegada do Bernardo ao mundo.
- A meus irmãos Sílvia, Sérgio e Alexandre; a minhas cunhadas Mônica e Luciane; a meus sobrinhos Andre e Julia; a meu avô Expedito Borja: agradeço por sempre apoiarem meu trabalho e me darem força para realizá-lo.

- Às minhas queridas amigas de faculdade Mariana Côrtes Boité, Cynthia de Assumpção Lucidi e Flávia Fernandes Uchôa, que embora não estejamos sempre juntas, a amizade só se fortalece a cada dia. Agradeço por ouvirem minhas reclamações, meus momentos de euforia e por todos esses anos de companheirismo.

-A Ana Flora Aguirre, pela amizade e apoio incondicional.

- A meus mestres de caratê, Ugo Arrigoni e Jayme Sandall, por todos os ensinamentos dentro do dojô que são úteis para a vida fora dele. Vocês são parte importante na minha vida.

- Aos animais, razão de minha profissão, essenciais para desenvolver esse trabalho, um de meus maiores amores.

Dedico este trabalho a meu sobrinho
Bernardo, que ele tenha uma vida feliz.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE QUADROS	xvii
LISTA DE TABELAS	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Família <i>Caliciviridae</i>	4
1.2.1. Características gerais	5
1.2.2. Gênero <i>Norovirus</i>	7
1.2.2.1. Histórico	7
1.2.2.2. Classificação	9
1.2.2.3. Partícula viral, genoma e proteínas.....	11
1.2.2.4. Replicação viral.....	14
1.2.2.5. Diversidade genética.....	15
1.2.2.6. Norovírus porcino	15
1.2.3. Gênero <i>Sapovirus</i>	18
1.2.3.1. Histórico	18
1.2.3.2. Classificação	18
1.2.3.3. Partícula viral, genoma e proteínas.....	19
1.2.3.4. Replicação viral.....	23
1.2.3.5. Diversidade genética.....	24
1.2.3.6. Sapovírus porcino	24
1.2.4. Diagnóstico laboratorial	26
1.2.5. Profilaxia	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30

4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Comissão de ética.....	31
4.2. Área de estudo e propriedades.....	31
4.3. Amostras para análise	33
4.4. Coleta de amostras	34
4.4.1. Suinoculturas.....	34
4.4.2. Abatedouro	35
4.5. Amostras controle	35
4.6. Detecção e caracterização molecular de calicivírus entéricos porcinos	36
4.6.1. Suspensão fecal a 20%.....	36
4.6.2. Extração do RNA viral pelo método da sílica.....	36
4.6.3. Transcrição reversa (RT).....	36
4.6.4. Amplificação parcial da região codificante da polimerase viral.....	37
4.6.5. Amplificação parcial da região codificante de VP1	39
4.6.6. Sequenciamento.....	41
4.6.7. Análise filogenética.....	41
4.7. Análise estatística	41
4.8. Soluções	42
4.8.1. Suspensão fecal.....	42
4.8.1.1. Tampão Tris/HCl/Ca ⁺⁺ 0,01M pH 7,2.....	42
4.8.2. Extração pelo método da sílica.....	42
4.8.2.1. EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) 0,2M pH 8,0	42
4.8.2.2. Tris-HCl 0,1M pH 6,4	42
4.8.2.3. Tampão L6 (tampão de lise)	42
4.8.2.4. Tampão L2 (tampão de lavagem)	42
4.8.2.5. Hidróxido de sódio (NaOH) 10N (solução para desprezar tampões L2 e L6).....	43
4.8.2.6. Sílica	43
4.8.2.7. Água RNaseOUT™	43
4.8.3. Eletroforese em gel de agarose.....	43

4.8.3.1. Tampão TBE 10X pH 8,4 (solução estoque)	43
4.8.3.2. Gel de agarose a 1,0 e 2,0%	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Detecção de calicivírus entéricos porcinos	44
5.2. Amplificação parcial da região codificante de VP1 de norovírus e sapovírus	46
5.3. Caracterização molecular de calicivírus entéricos porcinos	47
5.3.1. Análise filogenética de norovírus porcino	48
5.3.2. Análise filogenética de sapovírus porcino	55
6. DISCUSSÃO.....	64
6.1. Detecção de calicivírus entéricos porcinos	64
6.2. Amplificação parcial da região codificante de VP1 de calicivírus entéricos porcinos	66
6.3. Caracterização molecular de norovírus porcino	67
6.4. Caracterização molecular de sapovírus porcino	68
7. CONCLUSÕES	71
8. PERSPECTIVAS	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10. ANEXOS	86
10.1. Licença CEUA.....	86
10.2. Artigo.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	microlitro
g	grama
kb	quilobases
kDa	quilodáltons
h	hora
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanômetro
s	segundos
ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
CaV	calicivírus
cDNA	DNA complementar
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CME	criomicroscopia eletrônica
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBHSV	vírus da síndrome da lebre marrom europeia (“european brown hare syndrome virus”)
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EIA	ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FCV	calicivírus felino (“feline calicivirus”)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	genogrupo
GE	gastroenterite
GG	grupo genético
HBGA	antígenos de grupo histossanguíneo (“histo-blood group antigen”)
HEL	helicase
HuNoV	norovírus humano
HuSaV	sapovírus humano

ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IME	imunomicroscopia eletrônica
LaV	lagovírus
LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
ME	microscopia eletrônica
MNV	norovírus murino (“murine norovirus”)
NoV	norovírus
NS	proteína não estrutural
NTPase	nucleosídeo trifosfatase
ORF	fase aberta de leitura (“open reading frame”)
P	domínio P de VP1 (“protruding”)
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PEC	calicivírus entéricos porcinos (“porcine enteric caliciviruses”)
PIB	produto interno bruto
POL	polimerase
PoNoV	norovírus porcino
PoSav	sapovírus porcino
PoSav-Cowden	sapovírus porcino protótipo Cowden
ppm	parte por milhão
PRO	protease
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RHDV	vírus da doença hemorrágica do coelho (“rabbit hemorrhagic disease virus”)
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcrição reversa (“reverse transcription”)
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa
S	domínio S de VP1 (“shell”)
SARS	síndrome respiratória aguda grave (“severe acute respiratory syndrome”)
SaV	sapovírus
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SRSV	vírus pequenos de estrutura arredondada (“small round structured viruses”)

T	número de triangulação
TGI	trato gastrointestinal
Tris	hidroximetil-tris-aminometano
UTR	região não traduzida (“untranslated region”)
VESV	vírus do exantema vesicular do suíno (“vesicular exanthema of swine virus”)
VeV	vesivírus
VLP	partículas tipo vírus (“virus like particles”)
VP	proteína estrutural

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Organograma da produção de suíno destinado ao abate em suinocultura de ciclo completo.	2
Figura 1.2: Micrografia eletrônica de contraste negativo do vírus do exantema vesicular do suíno ilustrando morfologia clássica dos calicivírus (esquerda) e de calicivírus entérico (“small round structured virus”) com morfologia indefinida (direita). Barras: 100nm.	6
Figura 1.3: Organização genômica dos membros da família <i>Caliciviridae</i> . As amostras representantes de cada gênero e seus respectivos números de acesso ao GenBank são: <i>Lagovirus</i> – vírus da doença hemorrágica do coelho (M67473), <i>Norovirus</i> – vírus Norwalk (M87661), <i>Sapovirus</i> – vírus Manchester (X86560), <i>Vesivirus</i> – calicivírus felino (M86379).....	7
Figura 1.4: Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos da proteína do capsídeo viral (VP1) dos cinco genogrupos (G) de norovírus.	10
Figura 1.5: Proteína principal de capsídeo – VP1.	12
Figura 1.6: Organização genômica dos norovírus.	13
Figura 1.7: Imunomicroscopia eletrônica de sapovírus porcino - protótipo Cowden.	20
Figura 1.8: Organização genômica dos sapovírus.	21
Figura 1.9: Modelo de processamento proteolítico da poliproteína codificada pela fase aberta de leitura 1 de sapovírus.	22
Figura 4.1: Instalações típicas de suinocultura de ciclo completo.	32
Figura 4.2: Contenção e coleta de fezes por enema em leitão de maternidade.	34
Figura 4.3: Contenção e coleta de fezes por mão enluvada em animal de terminação.	35
Figura 5.1: Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos de RT-PCR.	44
Figura 5.2: Distribuição de amostras analisadas por classificação de consistência das fezes.	46
Figura 5.3: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR.	46
Figura 5.4: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR.	47
Figura 5.5: Árvore filogenética baseada na sequência de 253 nucleotídeos da região codificante da polimerase viral de norovírus.	50

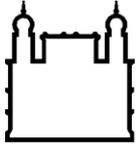
Figura 5.6: Árvore filogenética baseada na sequência de 71 aminoácidos da proteína de capsídeo VP1 de norovírus genogrupo II.....	53
Figura 5.7: Árvore filogenética baseada na sequência de 219 nucleotídeos da região codificante da polimerase viral de sapovírus..	57
Figura 5.8: Árvore filogenética baseada na sequência de 221 aminoácidos da região codificante da proteína de capsídeo VP1 de sapovírus..	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Estrutura taxonômica da família <i>Caliciviridae</i>	5
Quadro 1.2: Distribuição de genogrupos e genótipos de norovírus (NoV) em animais.....	11
Quadro 1.3: Classificação de sapovírus.....	19
Quadro 4.1: Reagentes utilizados na transcrição reversa com uso do kit High Capacity™ para obtenção de DNA complementar.	37
Quadro 4.2: Lista de iniciadores de cadeia utilizados para detecção de norovírus e sapovírus.....	38
Quadro 4.3: Reagentes utilizados na PCR para detecção de norovírus e sapovírus.....	38
Quadro 4.4: Lista de iniciadores de cadeia utilizados para amplificação parcial do genoma de norovírus e sapovírus na região da proteína principal de capsídeo (VP1).	40
Quadro 4.5: Reagentes utilizados na PCR para amplificação parcial da região codificante de VP1 (região D) de norovírus e condições da reação.	40
Quadro 4.6: Reagentes utilizados na PCR para amplificação parcial da região codificante de VP1 de sapovírus e condições da reação.	40
Quadro 5.1: Amostras utilizadas em análise filogenética e vírus/região do genoma correspondente com número de acesso ao GenBank.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Municípios, propriedades, tipo e classificação das amostras analisadas.....	33
Tabela 5.1: Frequência de detecção de norovírus e sapovírus porcino em 261 amostras fecais/conteúdo intestinal de suínos de propriedades localizadas no Estado do Rio de Janeiro de acordo com sua origem origem	44
Tabela 5.2: Frequência observada, segundo as fases de criação dos animais, de casos de infecção por calicivírus entéricos porcinos em suínos de propriedades localizadas no Estado do Rio de Janeiro	45
Tabela 5.3: Amostras positivas para calicivírus entéricos porcinos e sequências obtidas	48
Tabela 5.4: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de norovírus porcino brasileiras da região da polimerase viral.....	51
Tabela 5.5: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de norovírus porcino brasileiras da região da proteína de capsídeo VP1	54
Tabela 5.6: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo III da região da polimerase viral.....	58
Tabela 5.7: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo VII da região da polimerase viral	59
Tabela 5.8: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo não classificado da região da polimerase viral	60
Tabela 5.9: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras da região da proteína de capsídeo VP1	63



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

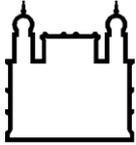
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CALICIVÍRUS ENTÉRICOS EM SUÍNOS DE REBANHOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Bragazzi Cunha

O presente estudo teve como objetivo identificar circulação de calicivírus entéricos porcinos (PEC) em fezes/conteúdo intestinal de suínos (*Sus scrofa*) de propriedades (suinoculturas e abatedouro) localizadas no Estado do Rio de Janeiro. Os PEC pertencem a dois gêneros da família *Caliciviridae*: *Norovirus* e *Sapovirus*. São capazes de causar gastroenterite (GE) aguda em animais e seres humanos. No entanto, o risco que representam à saúde pública é desconhecido. Foram coletadas 261 amostras em cinco municípios (Bom Jardim, Nova Iguaçu, Petrópolis, Piraí e Valença) no período de maio de 2007 a setembro de 2008. A detecção de PEC foi realizada por reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) e a caracterização molecular se deu por sequenciamento nucleotídico dos produtos obtidos na PCR e análise filogenética das sequências. Duas regiões parciais do genoma viral foram amplificadas: proteína principal do capsídeo viral (VP1) e RNA polimerase RNA dependente (RdRp). Foram detectadas 46 (17,6%) amostras positivas para PEC, sendo 20 (7,6%) para norovírus porcino (PoNoV) e 26 (10%) para sapovírus porcino (PoSaV). A classificação de PoNoV foi realizada por meio de análise filogenética das sequências obtidas das regiões da RdRp e VP1. Com base nas sequências da polimerase (POL) viral, dez amostras sequenciadas de PoNoV foram classificadas como genogrupo II (GII), genótipos 11 (cinco amostras) e 18 (cinco amostras). Na análise da região de VP1, de três sequências obtidas, duas foram classificadas como GII genótipo 19 (GII.19) e uma, como GII.18. Uma das amostras GII.19 é possível recombinante, pois, na região da RdRp, obteve diferente classificação (genótipo 11). PoSaV foram classificados por meio de análise filogenética de sequências obtidas das regiões da RdRp e VP1. Das 18 amostras sequenciadas de PoSaV na região da POL viral, sete foram classificadas como GIII e quatro, como GVII. Outras sete permaneceram sem classificação por apresentarem baixa identidade a protótipos e amostras integrantes de G já estabelecidos. Na análise da região de VP1, de três sequências obtidas, todas foram classificadas como GIII, sendo uma delas possível recombinante (classificada como GVII pela região da RdRp). Este estudo demonstra pela primeira vez circulação de PoNoV em rebanhos suínos brasileiros, além de confirmar presença de PoSaV no país. A evidência de possíveis recombinantes, em especial entre diferentes G, sugere que os PEC podem apresentar potencial zoonótico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CALICIVÍRUS ENTÉRICOS EM SUÍNOS DE REBANHOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Bragazzi Cunha

The aim of the present study was to identify porcine enteric caliciviruses (PEC) circulation in stool samples/intestinal contents of swines (*Sus scrofa*) from pig herds (pig farms and slaughterhouse) located in Rio de Janeiro State. PEC belong to two genera of the *Caliciviridae* family: *Norovirus* and *Sapovirus*. Both genera may cause acute gastroenteritis (GE) in animals and humans and the risk PEC represent to public health is unknown. Two hundred and sixty one samples were collected from five towns (Bom Jardim, Nova Iguaçu, Petrópolis, Piraí and Valença) from May 2007 to September 2008. PEC detection was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and molecular characterization of positive samples was carried out by nucleotide sequencing of PCR amplicons and phylogenetic analyses. Two partial regions from virus genome were sequenced: the main capsid protein (VP1) and RNA dependent RNA polymerase (RdRp). Forty six (17,6%) samples tested positive for the presence of PEC, 20 (7,6%) were positive for porcine norovirus (PoNoV) and 26 (10%) for porcine sapovirus (PoSaV). PoNoV sequences from both RdRp and VP1 regions were used in order to classifying positive samples by phylogenetic analyses. Based on polymerase (POL) sequences, ten samples were classified as genogroup II (GII), genotypes 11 (five samples) and 18 (five samples). On VP1 based analyses, out of three sequenced samples, two were classified as GII genotype 19 (GII.19) and one as GII.18. There was one GII.19 sample that might be a possible recombinant strain since it presented different classification by the POL region analysis (genotype 11). PoSaV sequences from both RdRp and VP1 regions were used in order to classifying positive samples by phylogenetic analyses. Out of 18 sequenced samples on the POL region, seven were classified as GIII and four as GVII. There were seven remaining strains that were not classified into any established G because they presented low identity to prototype strains and samples belonging to known G. On VP1 based analyses, all three sequenced samples were classified as GIII. One of them might be a possible recombinant since it presented different classification by the POL region analysis (GVII). This study shows for the first time PoNoV circulating in Brazilian pig herds and corroborates previous data of PoSaV circulation in the country. Evidence of possible recombinant strains, mostly between different G, suggests that PEC could present zoonotic potential.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O agronegócio representa importante segmento da economia mundial. O Brasil é um país onde parte significativa das divisas econômicas é gerada por essa atividade. O produto interno bruto (PIB) brasileiro do ano de 2007 alcançou 2,5 trilhões de reais, sendo 25% desse valor oriundo de atividades relacionadas à agropecuária (CEPEA, 2008). A exportação é uma importante fonte de renda para agricultores e pecuaristas (CNA, 2008) e realizar pesquisas com objetivo de proporcionar melhorias na sanidade e criação animal é essencial para que o produto final alcance exigências determinadas pelos mercados externo e interno.

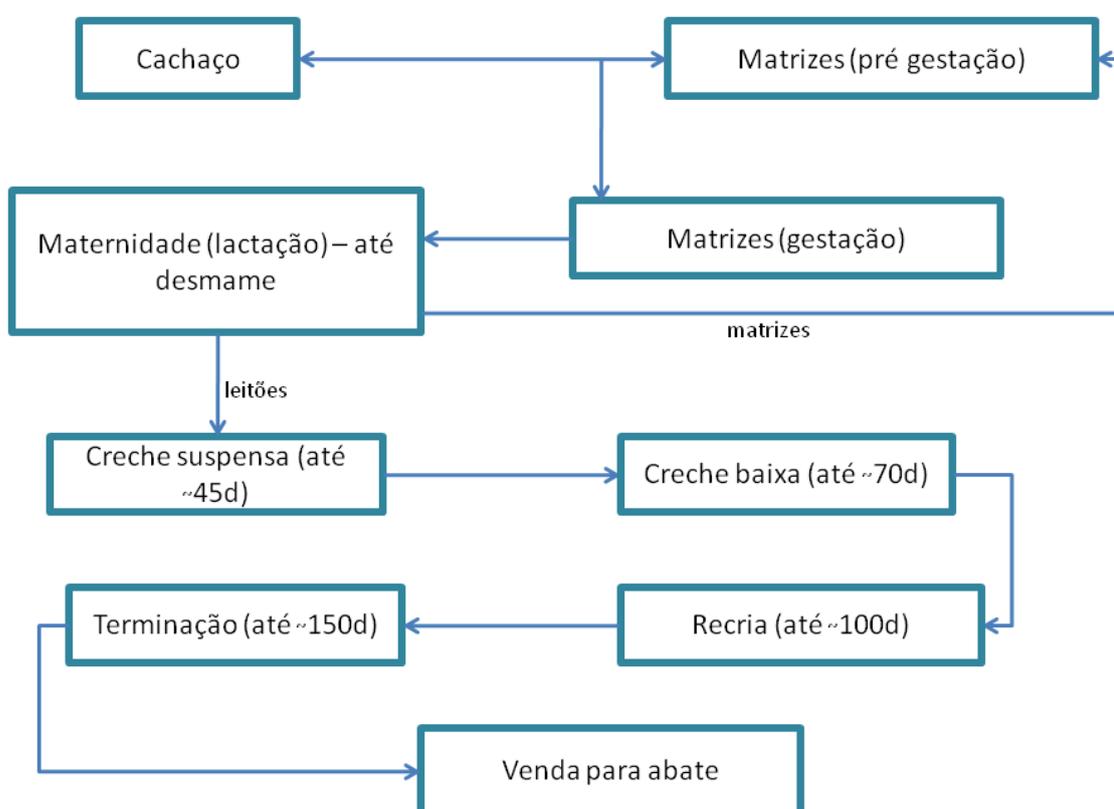
A carne suína é a mais produzida e consumida no mundo. Responde por aproximadamente 50% do consumo global de carnes. A suinocultura brasileira é tão moderna quanto a de países desenvolvidos e produtores tradicionais. A produção de suíno vivo é realizada, em grande parte, em sistema de integração do produtor com as agroindústrias que administram de forma eficiente a cadeia produtiva (Silveira & Talamini, 2007). É importante ressaltar que o Brasil ocupa o quarto lugar em produção e exportação de carne suína no mundo. No ano de 2008, foram exportadas cerca de 530 mil toneladas, o que representou queda de 12% ante o ano anterior. Ainda assim, o valor das vendas externas foi recorde com crescimento de 20% (1,48 bilhão de dólares contra 1,23 bilhão em 2007) (ABIPECS, 2009).

A sanidade dos rebanhos suínos brasileiros é uma das principais razões do Brasil apresentar grande competitividade no mercado internacional. Ações de vigilância sanitária são, portanto, essenciais para conquista de novos mercados e manutenção dos atuais. Assim, estudos relacionados à sanidade animal, ao diagnóstico e ao controle de doenças, à qualidade da carne e à segurança alimentar representam um desafio constante aos diferentes elos da cadeia (em especial, indústria, assistência técnica e pesquisa) (Silveira & Talamini, 2007).

A suinocultura industrial moderna é praticada de forma intensiva, ou seja, os animais são mantidos em confinamento total. A granja de ciclo completo apresenta todas as fases de criação de suínos: maternidade, creche, recria e terminação (Figura 1.1). Os reprodutores (matrizes e cachaços) permanecem em baias individuais. Quando a fêmea (porcas e marrãs – porcas de primeira cria) está próxima à data prevista de parto, ela é transferida para o galpão “maternidade”, onde permanece em baia individual própria para fêmeas em lactação (considera-se

que a fase de maternidade vai desde o nascimento dos animais até o desmame, que ocorre entre 21 e 28 dias) (Braga, 2000).

Os leitões desmamados seguem para a “creche suspensa”. Nessa fase juntam-se os leitões de diferentes leitegadas no mesmo local a fim de formar lotes homogêneos, permanecendo ali até 45 dias de idade, quando então seguem para a “creche baixa”, onde permanecem até 70 dias de idade. A fase de recria, por sua vez, é constituída por animais saídos da creche até cerca de 100 dias de idade. Na fase de terminação são encontrados animais a partir de 100 dias, até aproximadamente 150 dias de idade, quando estão prontos para o abate (*idem*).



Adaptado de Braga (2000)

Figura 1.1: Organograma da produção de suíno destinado ao abate em suinocultura de ciclo completo (d – dias).

O sistema de criação intensivo permite controle eficiente da suinocultura uma vez que o manejo dos animais é acompanhado de forma rigorosa (Braga, 2000; Vargas, 2002b). No entanto, a transmissão de doenças entre animais e desses para os seres humanos pode ser facilitada quando são utilizados métodos intensivos de produção. Além disso, a alta densidade populacional de humanos e de animais domésticos pode representar alto risco para surgimento de novas doenças (Vargas, 2002a; Ludwig *et al*, 2003).

Agentes causadores de zoonoses podem ser transmitidos por hospedeiros vertebrados ou artrópodes aos seres humanos. A infecção pode ser esporádica, sem que o agente estabeleça novo ciclo em seres humanos, ou pode ser permanente. Nessa última, o agente se estabelece na população humana sem que haja necessidade de um hospedeiro prévio ou reservatório animal (Ludwig *et al*, 2003).

A capacidade de um agente infeccioso em cruzar a barreira interespecies configura processo complexo e multifatorial. Para se entender a dinâmica envolvida na emergência de patógenos causadores de zoonoses, deve-se observar a interação entre o novo hospedeiro humano, o agente e os fatores ambientais. Os vírus, em especial os que possuem genoma constituído por molécula de RNA, possuem grande capacidade em se adaptar às mudanças de condições no ambiente por meio de sua grande diversidade genética. Tal característica favorece a quebra da barreira interespecies. Em decorrência, eles representam a classe mais importante de patógenos emergentes (*idem*).

A partir de 1940, os vírus começaram a ter seu papel como agentes causadores de GE estabelecido e, desde então, o número de vírus identificados em associação a GE aguda vem crescendo (Wilhelmi *et al*, 2003). Isto posto, rotavírus, adenovírus entéricos, astrovírus e calicivírus são agentes causadores de GE aguda em humanos bastante conhecidos. Já os coronavírus, picobirnavírus, pestivírus e torovírus, agentes que normalmente infectam animais, vêm sendo descritos como agentes emergentes causadores de diarreia em humanos (Wilhelmi *et al*, 2003; 2008). A transmissão de vírus animais a humanos pode levar a infecções mais graves que as determinadas pelos vírus humanos, como ocorreu com o vírus da influenza aviária H5N1 e o coronavírus responsável pela síndrome respiratória aguda grave (“SARS”) (Mattison *et al*, 2007).

Os vírus gastroentéricos que causam diarreia apresentam algumas características comuns: taxa de ataque alta, baixa dose infectante e grande resistência no meio ambiente (Olives & Mas, 2007). Sua transmissão ocorre por meio de contato com pessoas (infectadas) e pela ingestão de água ou alimentos (contaminados). A via de infecção é fecal-oral, embora também possa ser aérea – inalação seguida de ingestão de partículas virais (Marks *et al*, 2000; Olives & Mas, 2007).

Em países em desenvolvimento, há condições precárias de saneamento básico e estreita relação entre animais e humanos, o que favorece quebra de

barreira e consequente transmissão interespécies de patógenos (Arya *et al*, 2000; Wang *et al*, 2005a). Nesses países, há maior diversidade genética (Koopmans, 2008) e maior número de eventos de recombinação entre os vírus, como é observado com rotavírus grupo A (Cunliffe *et al*, 2002, Gentsch *et al*, 2005). Não é sem razão que a gastroenterite (GE) infecciosa aguda é importante problema de saúde pública mundial (Wilhelmi *et al*, 2003; 2008). Logo, programas de vigilância constante de surtos de GE aguda em humanos e animais devem ser conduzidos, tendo especial importância nos países em desenvolvimento (Wang *et al*, 2007; Koopmans, 2008).

Os calicivírus (CaV) entéricos, objeto do presente estudo, pertencem à família *Caliciviridae* e são representados pelos gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* (*Lagovirus* e *Vesivirus* são outros dois gêneros integrantes da família). Os membros desta família apresentam amplo espectro de hospedeiros e determinam doenças com manifestações clínicas distintas. *Lagovirus* (LaV) e *vesivirus* (VeV) causam doenças sistêmicas em animais. Já os *norovirus* (NoV) e *sapovirus* (SaV) podem levar à GE aguda em humanos e animais (Wang *et al*, 2007). Os CaV entéricos que infectam humanos apresentam semelhanças genéticas e antigênicas aos de animais, o que sugere potencial zoonótico desses agentes (Wang *et al* 2007; Scipioni *et al*, 2008).

1.2. Família *Caliciviridae*

Como já citado, a família *Caliciviridae* é composta por quatro gêneros: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus* e *Sapovirus* (Green, 2007). A denominação tem origem na palavra latina *calix* (cálice) pela sua aparência de taça, conferida pelas depressões na superfície das partículas virais, quando observadas por microscopia eletrônica (ME) de contraste negativo (Atmar & Estes, 2001).

A primeira descrição de infecção causada por CaV ocorreu em 1932, na costa leste dos Estados Unidos da América (EUA). Consistiu em uma epizootia de vírus do exantema vesicular do suíno (VESV). Na ocasião houve perda de 2,5 milhões de animais por morte devido à infecção, por abortamento ou pelo sacrifício de animais (com objetivo de erradicar a doença). Em 1956, ocorreu o último relato de surto de VESV e, em 1959, o país foi declarado livre da doença (Cubitt, 1994).

Os CaV foram inicialmente classificados como membros da família *Picornaviridae* e, em 1974, foi proposta a criação da família *Caliciviridae* (Burroughs & Brown, 1974). A proposta baseou-se em diferenças físico-químicas apresentadas pelos CaV quando comparados aos picornavírus, como maior diâmetro da partícula, maiores valores de coeficiente de sedimentação e composição polipeptídica da

partícula (composta por um único polipeptídeo principal), dentre outras (Burroughs & Brown, 1974). O primeiro registro da criação dessa nova família ocorreu em 1979, no Terceiro Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) (Matthews, 1979). Apenas no ano de 2002 foi estabelecida a atual classificação dos CaV em quatro gêneros (Mayo, 2002) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1: Estrutura taxonômica da família *Caliciviridae*.

Gênero	Espécie	Amostra representante
<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus</i>	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US
<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
<i>Lagovirus</i>	<i>RHDV</i> (vírus da doença hemorrágica do coelho)	Ra/LaV/RHDV/GH/1988/DE
	<i>EBHSV</i> (vírus da síndrome da lebre marrom europeia)	Ha/LaV/EHSV/GD/1989/FR
<i>Vesivirus</i>	<i>VESV</i> (vírus do exantema vesicular do suíno)	Sw/VeV/VESV/A48/1948/US
	<i>FCV</i> (calicivírus felino)	Fe/VeV/FCV/f9/1958/US

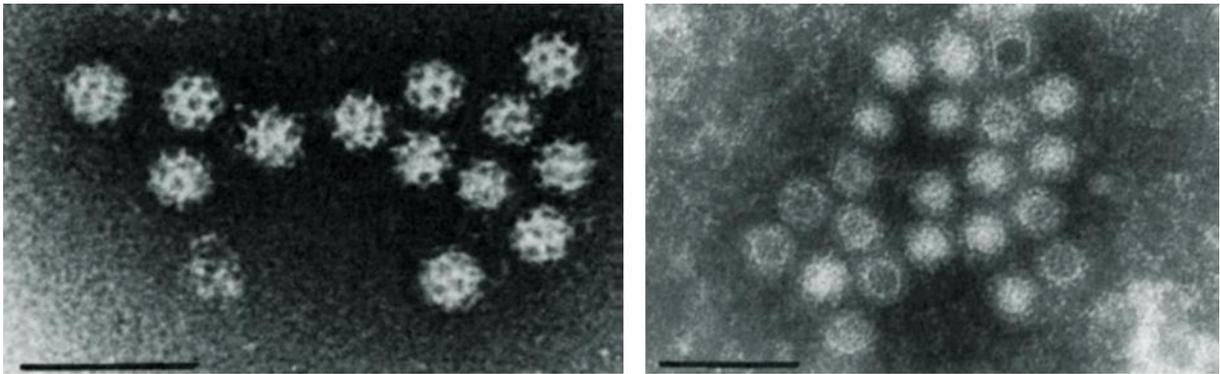
Adaptado de Green (2007)

Legenda: Hu – humano; Ra – coelho; Ha – lebre; Sw – suíno; Fe – felino; NoV – *Norovirus*; SaV – *Sapovirus*; LaV – *Lagovirus*; VeV – *Vesivirus*; G – genogrupo; US – Estados Unidos; JP – Japão; DE – Alemanha; FR – França. Denominação de amostra representante → hospedeiro/gênero/genogrupo (quando houver)/espécie/amostra representante/ano de identificação/país de origem.

1.2.1. Características gerais

Os CaV são vírus pequenos (27 a 40 nm de diâmetro), apresentam simetria icosaédrica com número de triangulação igual a 3 ($T=3$) e são desprovidos de envelope lipídico. Seu genoma é constituído por molécula de RNA linear, fita simples (7,2 a 8,5 quilobases – kb) de polaridade positiva, poliadenilada na extremidade 3'. Em sua extremidade 5', apresenta uma proteína ligada ao genoma (VPg) de forma covalente (Berke & Matson, 2000; Clarke & Lambden, 2000).

De acordo com sua aparência à ME de contraste negativo, os CaV podem ser classificados em vírus com morfologia clássica, apresentando 32 depressões em forma de taça no capsídeo viral, ou vírus com morfologia indefinida, também chamados de SRSV – do inglês “small round structured viruses”. SaV, VeV e LaV apresentam morfologia clássica. Mas NoV, algumas linhagens de FCV (um VeV) e LaV revelam estrutura indefinida, arredondada (Clarke & Lambden, 1997) (Figura 1.2).

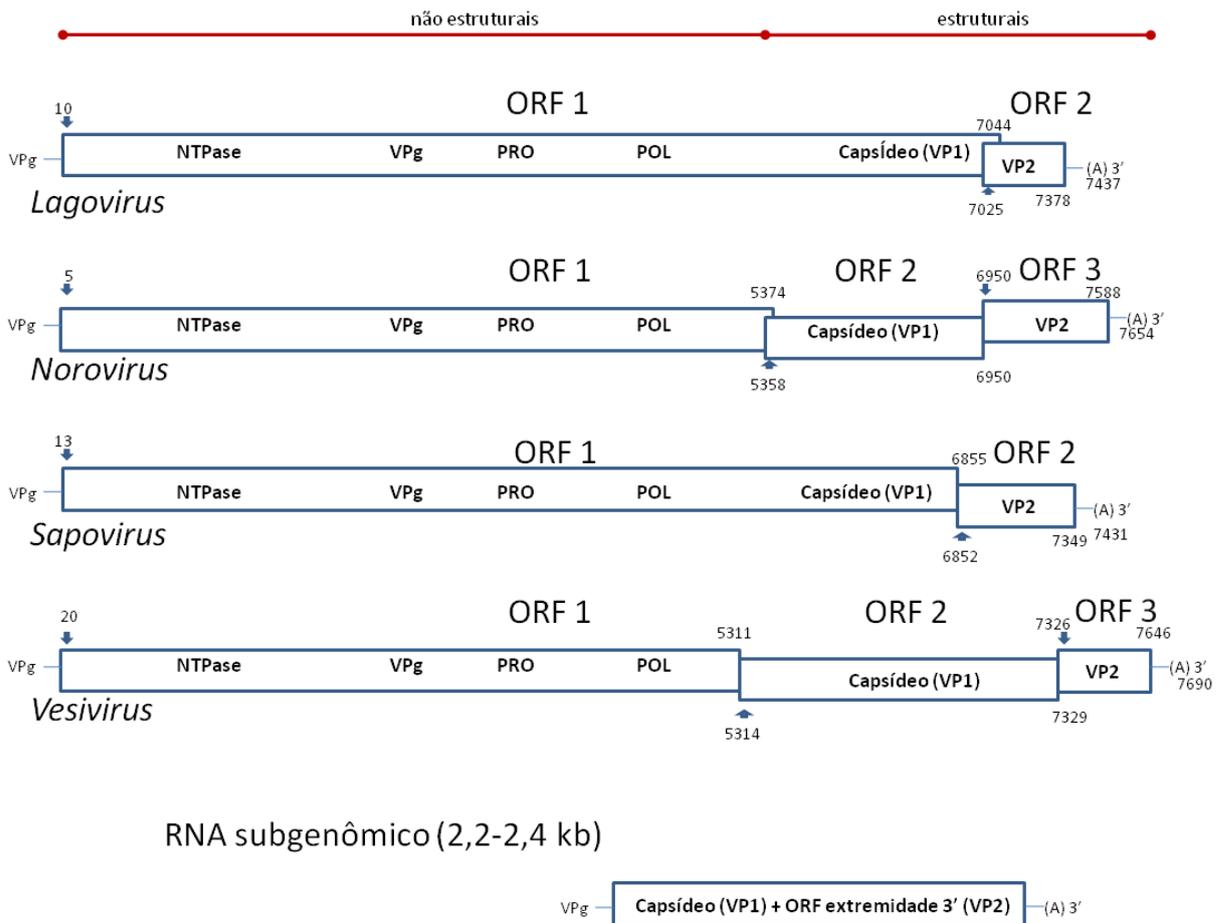


Adaptado de Murphy *et al* (1999)

Figura 1.2: Micrografia eletrônica de contraste negativo de vírus do exantema vesicular do suíno ilustrando morfologia clássica dos calicivírus (esquerda) e de calicivírus entérico com morfologia indefinida (direita). Barras: 100nm.

A densidade flutuante das partículas virais em cloreto de cério é de 1,35 a 1,39 g/cm³ (Cubitt, 1994). O coeficiente de sedimentação é de 170 a 187S. Em condições *in vitro*, as partículas mostraram-se estáveis em pH ácido na faixa de 4 a 5. Não são afetadas pelo tratamento com solventes lipídicos (éter ou clorofórmio) ou detergente e são resistentes ao calor. No entanto, registram-se algumas amostras sensíveis ao tratamento com tripsina (Murphy *et al*, 1999; ICTVdB, 2006).

O genoma dos CaV é organizado em duas ou três fases abertas de leitura (ORF), dependendo do gênero (Figura 1.3) – com exceção de NoV murino (MNV), que apresenta quatro (Thackray, 2007). As proteínas não estruturais (NS) são codificadas próximas à extremidade 5' da molécula de RNA, enquanto as proteínas estruturais (VP) são codificadas próximas à extremidade 3', região correspondente à do RNA subgenômico (Green, 2007). NoV e VeV apresentam fases de leitura separadas para a poliproteína NS e, outra, para a proteína principal do capsídeo viral. Já SaV e LaV apresentam a ORF codificante da poliproteína NS fusionada à proteína de capsídeo, formando uma longa sequência codificante contígua que ocupa maior parte do genoma (Clarke & Lambden, 1997). Todos os CaV apresentam uma pequena ORF na extremidade 3' codificante de uma proteína básica estrutural menos abundante (Clarke & Lambden, 1997; Green, 2007).



RNA subgenômico (2,2-2,4 kb)



Adaptado de Green *et al* (2000) & Green (2007)

Figura 1.3: Organização genômica dos membros da família *Caliciviridae*. As amostras representativas de cada gênero e seus respectivos números de acesso ao GenBank são: *Lagovirus* – vírus da doença hemorrágica do coelho (M67473), *Norovirus* – vírus Norwalk (M87661), *Sapovirus* – vírus Manchester (X86560), *Vesivirus* – calicivírus felino (M86379). Setas indicam primeiro códon iniciador na fase aberta de leitura (ORF); códons terminadores são indicados com números correspondentes aos nucleotídeos. As regiões previstas no RNA para nucleosídeo trifosfatase (NTPase), protease (PRO) e polimerase (POL) presentes em todos os calicivírus estão indicadas.

1.2.2. Gênero *Norovirus*

1.2.2.1. Histórico

A primeira descrição de NoV ocorreu no início da década de 1970, quando Kapikian *et al* (1972) descreveram partículas virais pequenas, com morfologia semelhante a picornavírus e parvovírus, por imunomicroscopia eletrônica (IME) em filtrado de amostras fecais de pacientes acometidos por GE aguda. As amostras eram provenientes de um surto que ocorrera em escola primária no ano de 1968, na cidade americana de Norwalk, dando origem à própria denominação do vírus (Kapikian *et al*, 1972; Kapikian, 2000). Nesse surto, 50% de professores e alunos adoeceram em até dois dias. O período de incubação deu-se em torno de 48 horas (h) e a doença teve duração média de 24 h. Ficou conhecida como doença do vômito de inverno (“winter vomiting disease”), por ser tal sinal a principal

manifestação apresentada pelos indivíduos acometidos, embora alguns tenham tido diarreia (Kapikian, 2000).

Após a descrição dos NoV com uso de IME, inicia-se uma nova fase na virologia: a virologia direta. Outros vírus fastidiosos, como rotavírus e astrovírus, dentre outros, foram caracterizados utilizando essa técnica (Green, 2007). Os CaV entéricos animais começaram a ser descritos no final da década de 1970 e início da década de 1980 por ME (Woode & Bridger, 1978; Saif *et al*, 1980).

Identificou-se o primeiro NoV animal em bovinos (*Bos taurus*) no ano de 1978, tendo sido detectado por ME em bezerros com diarreia no Reino Unido (Woode & Bridger, 1978). Em seguida, na Alemanha, outro NoV foi detectado em amostras fecais diarreicas de bezerros. O primeiro, conhecido como Newbury Agent 2, e o segundo, vírus Jena, são os protótipos do genogrupo (G) bovino (GIII) dentro do gênero NoV (Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008). Recentemente, houve a identificação de NoV GIII em ovinos por reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) e ME (Wolf *et al*, 2009).

Em 2003, MNV foi identificado em camundongos (*Mus musculus*). Este agente é capaz de causar doença sistêmica e fatal em animais imunocomprometidos, embora nesses roedores, quando imunocompetentes, a infecção seja assintomática. Os sinais são encefalite, vasculite cerebral, meningite, hepatite e pneumonia (Karst *et al*, 2003). Embora não seja NoV entérico típico (Wang *et al*, 2007), por ter sido estabelecido sistema de cultivo celular eficiente e infectar animal de pequeno porte, estudos com MNV vêm sendo desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* com objetivo de esclarecer pontos ainda obscuros sobre NoV não cultiváveis (como replicação viral, interação vírus-hospedeiro, resistência, patogenicidade, dentre outros).

Já a primeira descrição de NoV em suínos (*Sus scrofa*) ocorreu no Japão, em 1998. RNA viral foi detectado em conteúdo cecal (intestino grosso) de suínos clinicamente saudáveis por RT-PCR (Sugieda *et al*, 1998). Desde então, NoV já foram descritos infectando suínos de forma assintomática em fase de recria e terminação na Europa (Holanda, Hungria, Bélgica), EUA e Nova Zelândia (van der Poel *et al*, 2000; Wang *et al*, 2005a; Reuter *et al*, 2007; Mauroy *et al*, 2008; Wolf *et al*, 2009).

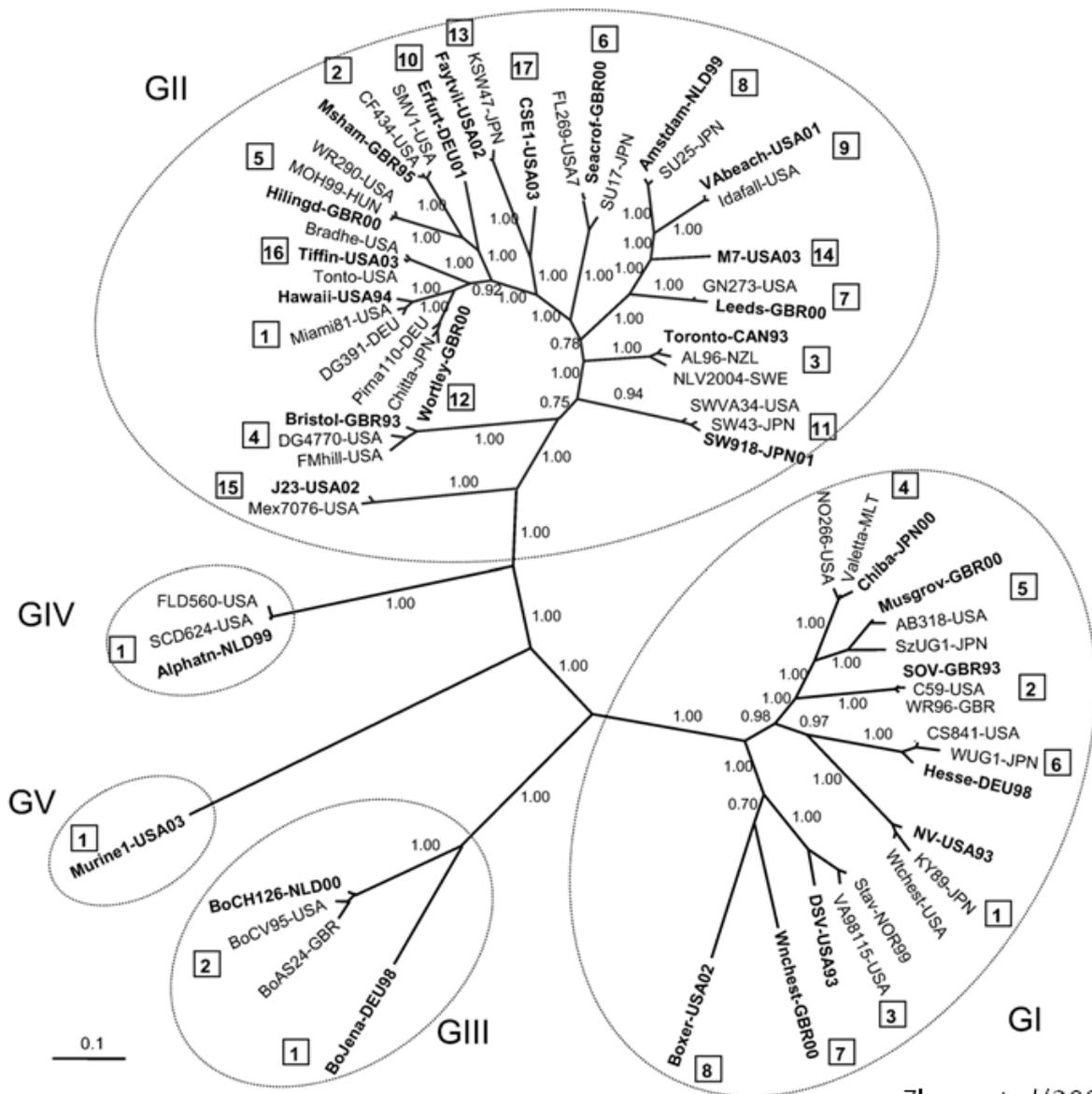
Os NoV porcinos (PoNoV) são os mais semelhantes aos humanos, sendo classificados como GII, o G mais encontrado nos surtos de GE em humanos (Scipioni *et al*, 2008).

1.2.2.2. Classificação

Nos anos de 1970 e 1980, a tipagem de NoV tinha como base métodos imunológicos envolvendo amostras clínicas humanas como fonte de antígenos e anticorpos. Entretanto, tais procedimentos não geraram classificação antigênica aceitável. Nos anos 1990, com uso de técnicas moleculares de amplificação, sequenciamento e expressão do genoma de NoV, tornou-se possível, finalmente, classificar esses vírus de forma mais fidedigna (Ando *et al*, 2000).

Abaixo do nível de espécie, há a divisão em G, ainda subdivididos em grupos genéticos (GG) ou genótipos (Green, 2007). GG representam unidade mínima de classificação dos NoV. Consistem em amostras agrupadas em um ramo determinado da árvore filogenética, próximas o suficiente (em nível aminoacídico ou nucleotídico) para serem distinguidas de amostras que não pertençam a esse grupo. G caracteriza a unidade de classificação superior a GG. Na verdade, consiste em GG agrupados em um ramo determinado da árvore filogenética, similares tanto a nível aminoacídico quanto nucleotídico, distintos de GG que estão fora do grupo (Ando *et al*, 2000).

Zheng *et al* (2006), tendo por suporte a sequência aminoacídica completa da ORF2 de diversas amostras de NoV, sugeriram classificação e nomenclatura uniforme para o gênero, sendo esta classificação amplamente utilizada (Figura 1.4).



Zheng *et al* (2006)

Figura 1.4: Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos da proteína do capsídeo viral (VP1) dos cinco genogrupos (G) de norovírus (algarismos arábicos indicam genótipos).

Divide-se o gênero NoV em cinco G (GI a GV). Os G I, II e IV são constituídos (respectivamente) por oito, 19 e 1 genótipos que infectam humanos. GIII e V, por sua vez, compõem-se por dois genótipos bovinos e um murino, respectivamente. As amostras de PoNoV pertencem ao GII e são classificadas em três genótipos diferentes: 11, 18 e 19 (Wang *et al*, 2005a; Zheng *et al*, 2006).

Recentemente, foi descrita infecção por NoV em filhote de leão (*Panthera leo*) e de cão (*Canis familiaris*). O primeiro apresentava enterite hemorrágica grave e o último, vômito e diarreia. Ambos os vírus apresentam 90,1% de identidade aminoacídica e pertencem ao GIV. Sugeriu-se, então, a criação de um segundo genótipo para este G (Martella *et al*, 2007; 2008c). Wolf *et al* (2009) descreveram infecção de NoV em ovinos (*Ovis aries*). O vírus pertence ao GIII, em que estão

classificados os NoV bovinos. No entanto, ele parece não pertencer a nenhum dos dois genótipos estabelecidos deste G: apresenta baixa identidade com os protótipos, com cerca de 72% de identidade aminoacídica na sequência completa de VP1, sendo, até então, um genótipo ainda indefinido (Wolf *et al*, 2009) (Quadro 1.2).

Quadro 1.2: Distribuição de genogrupos e genótipos de norovírus (NoV) por hospedeiro.

Hospedeiro	NoV genogrupos ^a (G) e genótipos ^b				
	GI	GII	GIII	GIV	GV
Humano	1-8	1-10, 12-17		1	
Suíno		11, 18, 19			
Ruminante			1, 2, 3 ^c		
Cão				2 ^c	
Leão				2 ^c	
Camundongo					1

Adaptado de Wolf *et al* (2009)

a → representados por algarismos romanos; b → representados por algarismos arábicos; c → novos genótipos (ainda não estabelecidos)

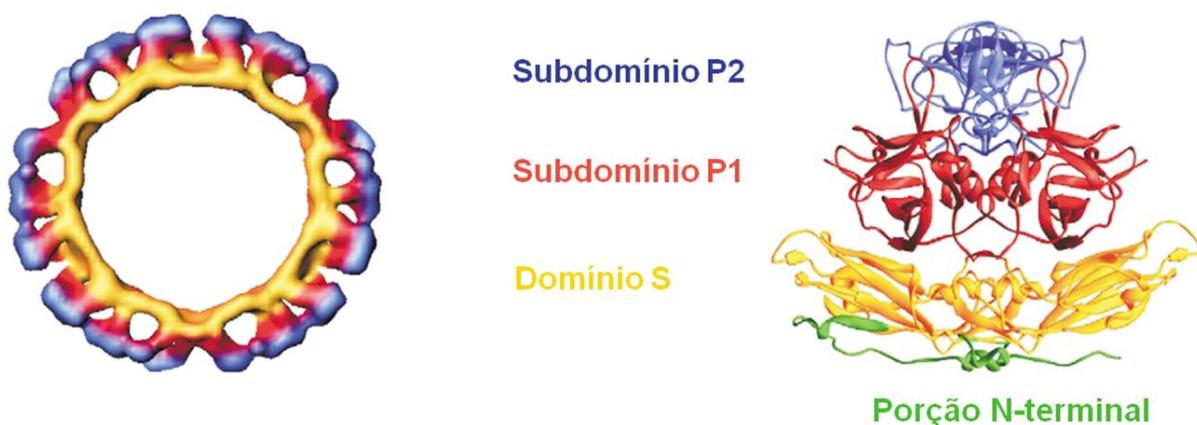
1.2.2.3. Partícula viral, genoma e proteínas

Os NoV apresentam vírion esférico com 38 nm de diâmetro, simetria icosaédrica com T=3 e superfície externa irregular quando observados por criomicroscopia eletrônica (CME) (Prasad *et al*, 1994). O genoma composto por RNA linear fita simples de polaridade positiva dos NoV tem cerca de 7,7 kb. Ele é organizado em três ORF com região não traduzida (UTR) nas extremidades 5' e 3' e cauda poli(A) (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2003).

O capsídeo viral é formado por 180 cópias da proteína VP1 (organizada em forma de dímeros) e por VP2, presente em somente uma ou duas cópias no vírion (Prasad *et al*, 1994; 1999; Green, 2007). Os 90 capsômeros, formados pela forma dimérica de VP1, dispõem-se em forma de arco e determinam 32 depressões proeminentes com 4 nm de profundidade e 9 nm de largura (Prasad *et al*, 1994).

A proteína principal do capsídeo viral (VP1) é formada por 530 a 555 aminoácidos, tendo aproximadamente 60 quilodaltosn (kDa). É ácida e apresenta dois domínios, S e P (de “shell” e “protruding”, respectivamente), ligados por estrutura flexível tipo “dobradiça”. O primeiro corresponde à porção amino-terminal da proteína (de aproximadamente 225 aminoácidos), é responsável pela formação da base (confere simetria icosaédrica à partícula), configura a porção interna do

capsídeo e está em contato com a molécula de RNA. Apresenta sequência aminoacídica conservada entre os CaV humanos. O domínio P emana da base composta por S e forma as protruções em forma de arco. Corresponde à porção caboxi-terminal de VP1 e apresenta dois subdomínios: P1 e P2. P1 apresenta-se relativamente conservado entre os CaV humanos e P2, sequência bastante variável, sendo também a região mais exposta do capsídeo. Os contatos diméricos constituídos pelos domínios P aumentam a estabilidade do capsídeo (Prasad *et al*, 1994; 1999; Glass *et al*, 2000; Hardy, 2005; Green, 2007). O subdomínio P2 (127 aminoácidos) situa-se no topo dos arcos e é a porção mais externa de VP1, sendo a região da proteína com maior variabilidade. Considera-se que esse domínio hipervariável atue como módulo substituível com capacidade de determinar especificidade antigênica e de ligação a receptores, além da diversidade da amostra (Chen *et al*, 2004; Hardy, 2005; Green, 2007) (Figura 1.5).



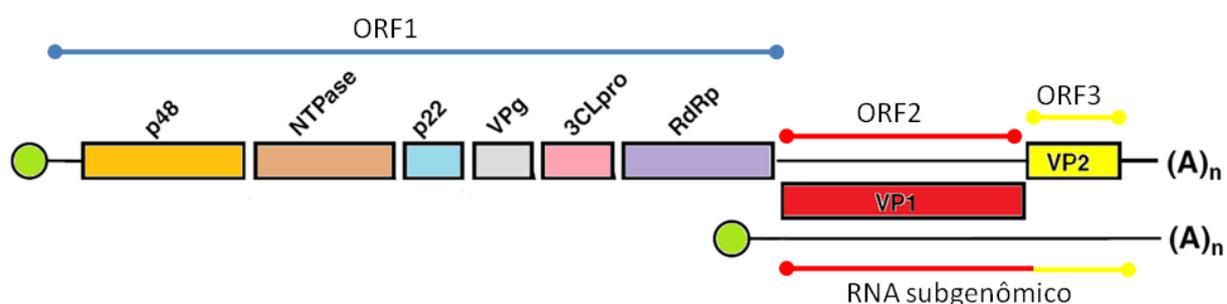
Adaptado de Hutson *et al* (2004)

Figura 1.5: Proteína principal de capsídeo – VP1. À esquerda, corte transversal do capsídeo viral. À direita, representação em fita de VP1 (forma dimérica). Cada domínio/subdomínio (P – “protruding”, S – “shell”) é representado por diferentes cores.

VP2 é uma proteína básica menor (e menos abundante) que VP1, de 22 a 29 kDa, presente em uma a duas cópias por partícula (Glass *et al*, 2000; Hardy, 2005). É constituída por 208 a 268 aminoácidos, exibe grande variação em sua sequência e ocorre em CaV humanos e animais (Hardy, 2005). Apresenta domínio de interação com VP1 e por ser uma proteína básica, supõe-se que ela esteja envolvida na encapsidação do ácido nucleico (Glass *et al*, 2000; 2003; Hardy, 2005). Por fim, especula-se sobre seu papel na replicação e montagem da partícula, além de conferir maior estabilidade à VP1, possibilitando tornar o vírion mais resistente a degradação proteolítica (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2003).

ORF1 codifica uma poliproteína NS de cerca de 200 kDa, clivada pela PRO viral (Belliot *et al*, 2005). Apresenta motivos característicos de helicase (HEL), cisteína protease e RNA polimerase RNA dependente (RdRp) (Gutiérrez-Escolano *et al*, 2003).

ORF2 e ORF3, por sua vez, codificam as proteínas estruturais do vírion, VP1 e VP2, respectivamente (Glass *et al*, 2000; Hardy, 2005). Os NoV produzem RNA subgenômico com aproximadamente 2,3 kb composto pelas ORF2 e 3 e pela 3'UTR (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2003; Wobus *et al*, 2004) (Figura 1.6).



Adaptado de Hardy (2005)

Legenda: ORF – fase aberta de leitura; p48 – proteína N-terminal; NTPase – proteína nucleosídeo trifosfatase; p22 – proteína p22; VPg – proteína ligada ao genoma; 3CLpro – protease; RdRp – polimerase; VP1 – proteína principal de capsídeo; VP2 – proteína secundária de capsídeo. Círculo verde – VPg; (A)_n – cauda poli(A).

Figura 1.6: Organização genômica dos norovírus.

A ação da PRO viral sobre a poliproteína NS resulta na formação de seis proteínas NS maduras. A poliproteína longa original nunca foi observada, provavelmente pelo processo proteolítico ser rápido e cotraducional. As proteínas NS são conhecidas como NS1-2, NS3 a 7 (da extremidade amino- para carboxi-terminal) (Sosnovtsev *et al*, 2006). NS1-2 corresponde à proteína N-terminal, NS3 à NTPase, NS4 à p22 (NoV GI) ou p20 (NoV GII), NS5 à VPg, NS6 à PRO e NS7 à POL viral (Belliot *et al*, 2003; Green, 2007) (Figura 1.5).

A proteína N-terminal (NS1-2) não apresenta homologia a qualquer sequência proteica viral ou celular descrita. Sua função é desconhecida, embora possa ter participação na montagem do complexo proteico de replicação, além de interagir com outras proteínas NS – p22, VPg, PRO, POL – (Hardy, 2005; Sosnovtsev *et al*, 2006). Assim como NS1-2, a proteína p22/20 (NS4) ainda não teve sua função elucidada. NS3, em contrapartida, tem função de NTPase (Hardy, 2005).

VPg (ou NS5) possui cerca de 15 kDa e liga-se à extremidade 5' do RNA genômico e subgenômico dos NoV de forma covalente. Em CaV animais e em vírus Norwalk desprovidos de VPg foi demonstrada queda significativa na síntese proteica viral *in vitro*. Supõe-se que ela tenha papel importante na infecciosidade do vírus e

tradução de proteínas virais, além de agir como iniciador na síntese de novas moléculas de RNA viral. Como proteína estrutural, VPg desempenha função no empacotamento da molécula de RNA viral na partícula (Hardy, 2005; Sosnovtsev *et al*, 2006; Guix *et al*, 2007).

Responsável pela liberação de proteínas NS codificadas pela ORF1, além de clivar proteínas celulares, NS6 tem atividade de proteinase (Green, 2007). O complexo intermediário PRO-POL foi descrito como forma ativa das enzimas PRO e POL (Belliot *et al*, 2003). No entanto, em cultivo celular com MNV, pouca quantidade dele foi detectada, sugerindo que atue de forma transitória na replicação viral (Sosnovtsev *et al*, 2006).

NS7 possui características de POL viral, congregando elementos catalíticos e estruturais (domínios) característicos das RdRp de outros vírus RNA de fita positiva (Hardy, 2005). A síntese de RNA é iniciada a partir da extremidade 3' do RNA genômico e das moléculas intermediárias de RNA do processo replicativo (Gutiérrez-Escolano, 2003).

1.2.2.4. Replicação viral

Segundo Green (2007), as interações iniciais entre vírus e célula, como ligação a receptor, entrada na célula e liberação do ácido nucleico, ainda não foram esclarecidas. Assinala o autor que os estudos sobre replicação viral são prejudicados pela falta de modelo animal e sistema de cultivo celular eficientes. (Green, 2007).

Antígenos do grupo histo-sanguíneo (HBGA) atuam como receptores para os NoV e mediam sua infectividade. A interface formada pelo receptor e proteína viral localiza-se no subdomínio P2, onde há estrutura em forma de "bolso", e outra (próxima à primeira) constituída por três aminoácidos responsáveis pela ligação com o receptor. Há grande diversidade nas ligações entre vírus e os HBGA, que variam de acordo com a amostra viral (Tan & Jiang, 2005).

O início da tradução do RNA viral é mediado por interações entre VPg e os componentes celulares para tradução (Guix *et al*, 2007). Tem início a síntese da fita negativa de RNA a partir da extremidade 3' da fita molde do RNA genômico. A fita negativa, então, serve de molde para transcrição de dois tipos de moléculas de RNA: RNA genômico e subgenômico (Green, 2007). A RdRp viral é a enzima responsável pela transcrição das moléculas de RNA (Katayama *et al*, 2006).

A estratégia de replicação inclui processamento proteolítico da poliproteína pela PRO viral com liberação de proteínas NS (Katayama *et al*, 2006; Sosnovtsev *et*

al, 2006). O RNA subgenômico serve como molde para síntese de proteínas estruturais (Green, 2007).

Os mecanismos de empacotamento do RNA viral, maturação e liberação da partícula são pouco conhecidos. A liberação de partículas virais pode estar associada a mudanças nas membranas celulares provocadas por apoptose (Green, 2007).

1.2.2.5. Diversidade genética

Os NoV apresentam grande diversidade genética (Ando *et al*, 2000). Há dúvidas se a evolução dos NoV depende do acúmulo de mudanças causadas por mutações pontuais ou recombinação homóloga envolvendo regiões codificantes de proteínas estruturais e NS (Rohayem *et al*, 2005).

A RdRp viral não possui atividade de reparo (“proofreading”) e, por essa razão, mutações ocorrem de forma frequente (Nayak *et al*, 2008). Em um paciente com diarreia crônica causada por NoV, foram encontradas mutações pontuais nas regiões codificantes da POL viral e capsídeo. As mutações ocorridas na região do capsídeo viral poderiam ter sido direcionadas pela resposta imune do hospedeiro, enquanto as da região codificante da POL parecem resultar da ausência da atividade de reparo desta enzima (Nilsson *et al*, 2003).

Dentre os relatos de recombinação descritos para NoV GI, II e III, a maior parte ocorreu na região de junção das ORF1 e 2 dentro de um mesmo G (Bull *et al*, 2007). Essa região é conhecida como um “hot spot”, ou seja, um local altamente propenso a ocorrer recombinação. Nela é encontrado o promotor de RNA subgenômico, que forma estrutura em forma de alça bastante conservada entre os G de NoV. Tais características são favoráveis à ocorrência de recombinação quando há coinfeção de uma célula por dois NoV diferentes (Bull *et al*, 2005). Já foram identificados eventos de recombinação nas regiões do capsídeo (Rohayem *et al*, 2005) e da POL (Bull *et al*, 2007).

Nayak *et al* (2008) relataram ocorrência de recombinação entre G diferentes. Esta amostra exibiu maior semelhança a NoV GI genótipo 3 (GI.3) na região da POL e, na região do capsídeo, a NoV GII.4. O sítio de recombinação ocorreu na região de junção das ORF1 e 2.

1.2.2.6. Norovírus porcino

Os NoV porcinos (PoNoV) foram descritos pela primeira vez no Japão em 1998. Em 1117 amostras de conteúdo intestinal coletadas do ceco de suínos saudáveis, apenas quatro foram identificadas como positivas para NoV por RT-PCR.

Na árvore filogenética agruparam com outros “SRSV” humanos do GII, no entanto em ramo distinto dos vírus de origem humana. Foi a primeira evidência de NoV animais estreitamente relacionados aos NoV humanos (HuNoV) então conhecidos (Sugieda *et al*, 1998). Após esse relato, foram detectados PoNoV na Holanda semelhantes aos descritos no Japão. Embora não houvesse conhecimento do estado de saúde dos animais amostrados, eles tinham mais de três meses de idade (van der Poel *et al*, 2000).

Posteriormente, PoNoV vêm sendo descritos em suínos, em fase de recria e terminação, sem sinais clínicos, com frequência de detecção variável (Scipioni *et al*, 2008). Encontram-se relatos de PoNoV nos EUA (Wang *et al*, 2005a ; Costantini *et al*, 2006); Hungria (Reuter *et al*, 2007); Canadá (Mattison *et al*, 2007); Bélgica (Mauroy *et al*, 2007) e Nova Zelândia (Wolf *et al*, 2009). Verificou-se, em levantamento sorológico de suínos realizado no Japão e EUA, grande número de amostras reativas a PoNoV protótipo Sw918/GII.11. Esses dados sugerem ampla distribuição mundial de PoNoV (Farkas *et al*, 2005).

Dentre os NoV animais, os porcinos são os mais próximos aos HuNoV. São classificados como GII (genótipos 11, 18 e 19). Os NoV GII são o mais frequentemente encontrados causando surtos de GE aguda em humanos (Scipioni *et al*, 2008). Embora pertençam a genótipos diferentes dos humanos, o genótipo 18 (representado pelas amostras QW101 e QW125) é constituído por vírus com maior identidade aminoacídica a HuNoV GII.3 (protótipo México) (Wang *et al*, 2005a).

Antissoro de fase convalescente de suínos inoculados com PoNoV genótipo 18 apresentou reação cruzada com partículas tipo vírus (VLP) de HuNoV. Esse achado indica que PoNoV GII.18 revela semelhança antigênica com HuNoV. Verificou-se, também, que os vírus integrantes do genótipo 18 apresentaram maior identidade aminoacídica a HuNoV que a outros PoNoV (genótipos 11 e 19) (Wang *et al*, 2005a).

Integrantes do genótipo 19 (representado pelos protótipos QW170 e QW218) são vírus possivelmente recombinantes e mais próximos a PoNoV que a HuNoV. Na árvore filogenética, quando a região analisada é da POL viral, agrupam-se junto às amostras do genótipo 11. No entanto, na região do capsídeo formam um ramo distinto. O ponto de recombinação das amostras pertencentes a este genótipo foi encontrado na região de junção entre POL e capsídeo do genoma viral. Contudo não foi possível determinar qual amostra é a parental e qual a recombinante (Wang *et al*, 2005a).

A patogenia da infecção determinada por PoNoV ainda não foi elucidada, necessitando ser esclarecida. Até o presente só foram identificados suínos infectados por NoV sem sinais clínicos (Scipioni *et al*, 2008).

Suínos são bons modelos para doenças entéricas de humanos porque seu trato gastrointestinal (TGI) apresenta semelhanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas ao TGI dos seres humanos (Cheetham *et al*, 2006). Além disso, estes animais expressam HBGA (A e H, do sistema ABH humano) em seu TGI semelhantes aos antígenos humanos aos quais se ligam os NoV (Cheetham *et al*, 2007; Tian *et al*, 2007). A especificidade demonstrada pelos HBGA de suínos aos HuNoV foi, de forma geral, semelhante à observada com HBGA humanos (Tian *et al*, 2007). Em estudo realizado com suínos gnotobióticos inoculados com HuNoV GII.4, amostra HS66, foi observado que os animais, de forma análoga aos humanos, exibiram: diferentes níveis de resistência ou susceptibilidade; presença ou ausência de soroconversão; gravidade e duração dos sinais clínicos e, excreção de vírus nas fezes (Cheetham *et al*, 2006).

O suíno como modelo animal pode ter um importante papel no estudo da patogenia e infecção por HuNoV, fornecendo informações essenciais a respeito de interações vírus-célula, tropismo tecidual e sítio de replicação do vírus, dentre outras (Cheetham *et al*, 2006; 2007; Tian *et al*, 2007).

Além das semelhanças apresentadas entre hospedeiros, há também semelhança genética e antigênica entre os PoNoV e HuNoV. Isso sugere que transmissão interespecíes possa ocorrer (Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008). Investigações demonstraram que os HuNoV são capazes de causar infecção e doença em suínos gnotobióticos, além da recente detecção de NoV semelhante ao HuNoV GII.4 em amostras de esterco, achados que reforçam tal possibilidade (Cheetham *et al*, 2006; Mattison *et al*, 2007).

Dentre os relatos referentes ao papel dos suínos como reservatórios e transmissores de NoV para seres humanos destacam-se: 1) a ocorrência de forma natural de recombinação entre NoV; 2) o recente relato de recombinação entre diferentes genogrupos (Nayak *et al*, 2008); 3) a existência de NoV bovino quimérico no GIII (Oliver *et al*, 2004) e de PoNoV recombinante (Wang *et al*, 2005a) e 4) a classificação comum de PoNoV e HuNoV dentro do GII (Wang *et al*, 2005a; Zheng *et al*, 2006) gera especulações sobre o fato de suínos poderem funcionar como reservatório para infecção humana por NoV (Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008).

1.2.3. Gênero *Sapovirus*

1.2.3.1. Histórico

A primeira identificação de vírus com morfologia clássica de CaV em fezes de humanos foi realizada por Madeley & Cosgrove (1976) e Flewett & Davies (1976) por ME direta em fezes de crianças com ou sem sinais clínicos e de caso de GE fatal, respectivamente.

No entanto, primeira descrição de SaV como causa de GE aguda ocorreu no ano de 1979, na cidade de Sapporo, Japão. Partículas virais com morfologia clássica de CaV foram detectadas por ME em fezes oriundas de surto de GE ocorrido em orfanato no ano de 1977. Na época, 34 crianças residiam no orfanato e 26 (77%) apresentaram diarreia (Chiba *et al*, 1979). Nos anos seguintes SaV foram associados a vários surtos e casos esporádicos de GE (Chiba *et al*, 2000) e hoje é reconhecido como importante agente causador de diarreia em crianças de até cinco anos de idade e em idosos (Wang *et al*, 2007).

Em 1980, nos EUA, foi identificado o primeiro SaV porcino (PoSaV), protótipo Cowden. Foram observadas por ME partículas com morfologia clássica de CaV em amostra fecal de leitão (Saif *et al*, 1980). PoSaV foram descritos nos EUA (Saif *et al*, 1980), Japão (Yin *et al*, 2006), Coreia do Sul (Kim *et al*, 2006), Venezuela (Martínez *et al*, 2006), Hungria (Reuter *et al*, 2007), Brasil (Barry *et al*, 2008a), Itália (Martella *et al*, 2008a), China (Zhang *et al*, 2008) e Bélgica (Mauroy *et al*, 2008).

A única descrição de SaV em martas (*Martes americana*) ocorreu no ano de 2001 nos EUA, em fazenda com histórico de surto de diarreia em sua criação. Partículas com morfologia clássica de CaV foram detectadas por IME com anticorpos contra PoSaV protótipo Cowden (PoSaV-Cowden) em fezes de filhotes. O vírus encontrado foi confirmado como SaV por RT-PCR e sequenciamento nucleotídico (Guo *et al*, 2001a).

1.2.3.2. Classificação

A classificação de SaV, a exemplo do que é adotado para NoV (Ando *et al*, 2000; Green *et al*, 2000; Zheng *et al*, 2006), baseia-se na sequência completa da proteína de capsídeo (Schuffenecker *et al*, 2001; Farkas *et al*, 2004). Assim como para NoV, há três níveis de classificação para SaV: cepa, genótipo (ou GG) e G (Schuffenecker *et al*, 2001). Em razão de sua grande diversidade genética e ao fato de vírus recombinantes serem comuns, uma classificação consistente ainda não foi estabelecida. Por esta razão, classificação além do nível de G é controversa (Martella *et al*, 2008a). No entanto, a classificação proposta por Schuffenecker *et al*

(2001) e Farkas *et al* (2004) é atualmente utilizada (Gallimore *et al*, 2006; Green, 2007).

Os SaV são divididos em cinco G, sendo GI, II e IV constituídos por vírus que infectam humanos, já o GIII é formado por vírus que infectam suínos. Há no mínimo nove genótipos dentro dos cinco G de SaV. GI e II são formados por três genótipos cada, enquanto GIII, IV e V apresentam apenas um genótipo (Schuffenecker *et al*, 2001; Farkas *et al*, 2004). Recentemente, foi sugerida criação de dois novos G compostos por PoSaV: GVI e VII, representados pelas amostras JJ681 e K7, respectivamente (Wang *et al*, 2005b ; Yin *et al*, 2006). No Quadro 1.3 estão descritos os diferentes G e genótipos com suas respectivas amostras protótipo.

Quadro 1.3: Classificação de sapovírus.

Genogrupo	Genótipo	Protótipo
I	1	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
	2	Hu/SaV/GI.2/Parkville/1994/US
	3	Hu/SaV/GI.3/Stockholm318/1997/SE
II	1	Hu/SaV/GII.1/London/1992/UK
	2	Hu/SaV/GII.2/Mex340/1990/MX
	3	Hu/SaV/GII.3/Cruise ship/2000/US
III	1	Sw/SaV/GIII.1/PEC-Cowden/1980/US
IV	1	Hu/SaV/GIV.1/Hou7-1181/1990/US
V	1	Hu/SaV/GV.1/Argentina39/AR
VI	1	Sw/SaV/GVI/JJ681/2000/US
VII	1	Sw/SaV/GVII/K7/JP

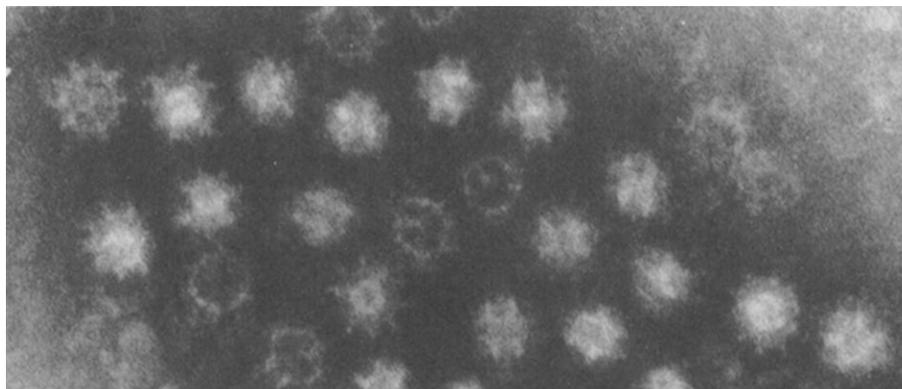
Adaptado de Green (2007)

Legenda: Hu – humano; Sw – suíno; SaV – *Sapovirus*; G – genogrupo; JP – Japão; US – Estados Unidos; SE – Suécia; UK – Reino Unido; MX – México; AR – Argentina. Denominação de protótipo → hospedeiro/gênero/genogrupo/amostra protótipo/ano de identificação/país de origem.

1.2.3.3. Partícula viral, genoma e proteínas

Os SaV apresentam vírion esférico com 35 a 39 nm de diâmetro, simetria icosaédrica com T=3. O capsídeo viral é formado por 180 cópias de uma única proteína principal, VP1. Organizada na forma de dímeros, VP1 forma 90 capsômeros dispostos em forma de arco responsáveis pela formação de 32 depressões proeminentes que conferem à partícula aparência de taça quando observada por ME (Atmar & Estes, 2001; Chen *et al*, 2004; ICTVdB, 2006; Green, 2007) (Figura 1.7). Estruturalmente, os SaV revelam maior semelhança a CaV

animais (Chen *et al*, 2004) e, por apresentarem morfologia característica dos membros da família *Caliciviridae*, os SaV humanos (HuSaV) são também conhecidos como CaV humanos clássicos (Green *et al*, 2000; Green, 2007).

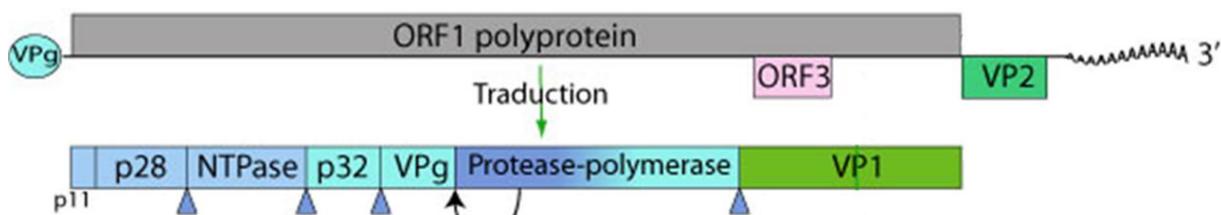


Adaptado de Saif *et al* (1980)

Figura 1.7: Imunomicroscopia eletrônica de sapovírus porco - protótipo Cowden.

Assim como outros membros da família *Caliciviridae*, os SaV caracterizam-se pelo genoma constituído por molécula de RNA linear fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7,1 a 7,5 kb, sendo pouco menor que o genoma dos NoV. Apresenta uma proteína covalentemente ligada ao genoma (VPg) em sua extremidade 5', UTR nas extremidades 5' e 3' e cauda poli-A na extremidade 3' (Liu *et al*, 1995; Chang *et al*, 2005; Green, 2007; Wang *et al*, 2007). De forma semelhante ao genoma dos LaV, a poliproteína NS é fusionada à proteína principal de capsídeo viral e são codificadas pela ORF1 (Clarke & Lambden, 2000). Os SaV GI, IV e V apresentam três ORF e os integrantes dos GII e III possuem duas ORF (Farkas *et al*, 2004).

ORF1 codifica longa poliproteína não estrutural fusionada à VP1 (250 kDa) localizada na extremidade 5' do genoma viral. Apresenta domínios característicos de NTPase, VPg, PRO, POL e VP1 dos CaV (Liu *et al* 1995; Oka *et al*, 2005a; 2006; Hansman *et al*, 2008). As proteínas NS são conhecidas como NS1 a 7 e a poliproteína encontra-se organizada da seguinte forma (da extremidade amino- para carboxi-terminal): NS1 (p11), NS2 (p28), NS3 (NTPase), NS4 (p32), NS5 (VPg), NS6-7 (PRO-POL) e VP1 (Oka *et al*, 2006) (Figura 1.8).



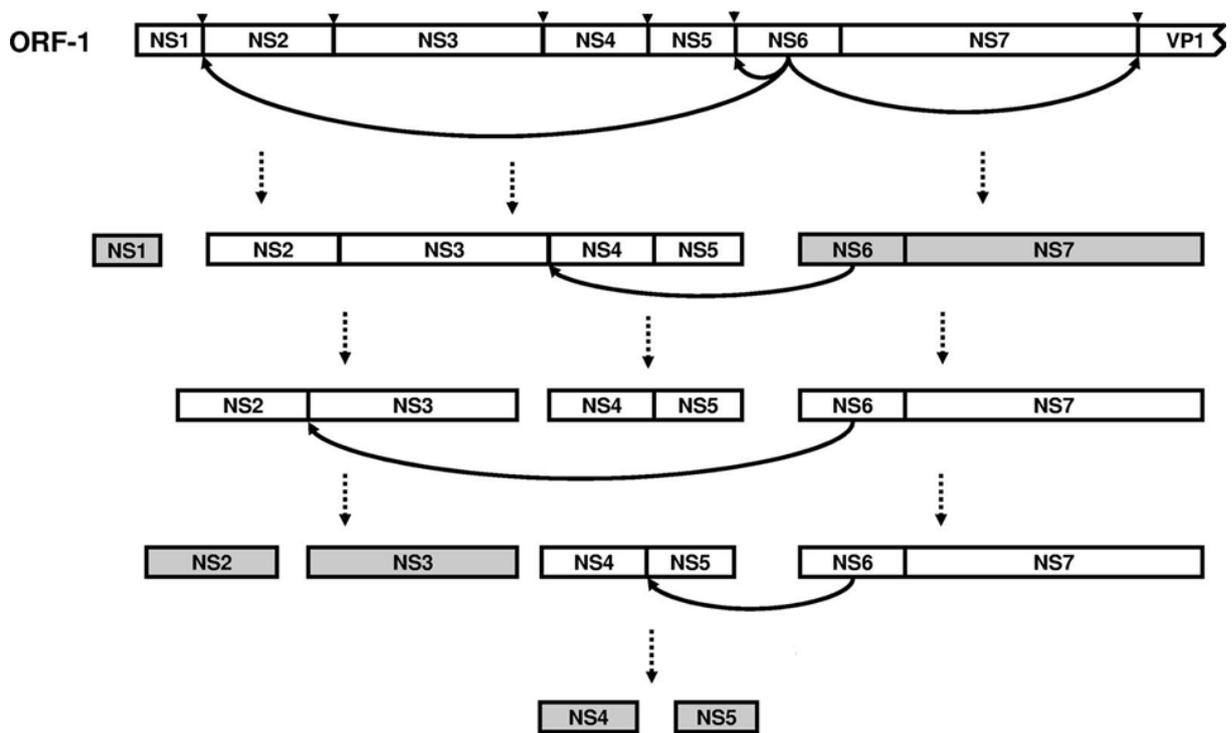
Adaptado de Instituto Suíço de Bioinformática (www.expasy.ch/viralzone)

Legenda: Círculo azul – VPg; ORF1 polyprotein – poliproteína codificada pela fase aberta de leitura 1; ORF3 – fase aberta de leitura 3; VP2 – proteína secundária de capsídeo viral; AAAAAAAAAA 3' – cauda poli(A); p11 – proteína p11; p28 – proteína p28; NTPase – proteína nucleosídeo trifosfatase; p32 – proteína p32; Vpg – proteína ligada ao genoma; Protease-polymerase – proteínas protease e polimerase; VP1 – proteína principal de capsídeo.

Figura 1.8: Organização genômica dos sapovírus.

ORF2 codifica uma proteína básica, VP2 (proteína estrutural secundária com cerca de 17 kDa), de função ainda desconhecida. ORF3 encontra-se em fase de leitura diferente e sobreposta à ORF1, na região codificante de VP1 e poderia codificar proteína básica (Clarke & Lambden, 2000; Atmar & Estes, 2001; Green, 2007; Hansman *et al*, 2008) (Figura 1.8). Uma outra ORF semelhante à ORF3 de SaV foi identificada em MNV. Essa é uma quarta ORF que se encontra em fase de leitura diferente e sobreposta à região codificante de VP1 (Thackray *et al*, 2007). No entanto, o significado desta terceira ORF no genoma dos SaV ainda não foi esclarecido e há controvérsias sobre sua função biológica. Essa região apresenta baixa identidade entre os SaV e codifica uma proteína predita que não tem homologia com nenhuma proteína conhecida, gerando dúvidas se realmente possui atividade biológica (Clarke & Lambden, 2000; Atmar & Estes, 2001). Contudo, a presença de um motivo conservado de iniciação para tradução na sequência de sua extremidade 5' sugere a possibilidade de codificação de proteína funcional por essa ORF (Schuffenecker *et al*, 2001).

Assim como ocorre com NoV, a poliproteína longa de 250 kDa não é observada. Tal fato indica ocorrência de rápido processamento proteolítico após tradução, bem como processamento cotraducional. A PRO viral (NS6) é a enzima responsável pela clivagem e liberação de produtos intermediários e finais de clivagem e desempenha papel essencial na replicação viral (Oka *et al*, 2005b; Robel *et al*, 2008). Robel *et al* (2008), em estudos desenvolvidos *in vitro*, propuseram esquema de processamento proteolítico da poliproteína dos SaV ilustrado na Figura 1.9.



Adaptado de Robel *et al* (2008)

Legenda: ORF1 – fase aberta de leitura 1; NS – proteína não estrutural; VP1 – proteína principal de capsídeo viral.

Figura 1.9: Modelo de processamento proteolítico da poliproteína codificada pela fase aberta de leitura 1 de sapovírus.

A POL viral (NS7) é responsável pela replicação do genoma. Ela apresenta estrutura semelhante a RdRp de outros vírus RNA de fita positiva. Assim como a POL de NoV, a RdRp de SaV apresenta o domínio carboxi-terminal localizado na fenda do sítio ativo da enzima (Fullerton *et al*, 2007).

A forma ativa encontrada das enzimas PRO e POL em estudos *in vitro* (Chang *et al*, 2005; Oka *et al*, 2005a; 2005b; Fullerton *et al*, 2007) e em cultivo celular (Chang *et al*, 2005) é de uma proteína com 70 kDa. NS6-7 parece não ser clivada, tendo a forma madura das proteínas dois motivos característicos: POL e PRO (Chang *et al*, 2005; Oka *et al*, 2005a; 2005b; Fullerton *et al*, 2007).

VP1, VP2 e VPg são encontradas na partícula viral madura (Green, 2007). VP1 é formada por cerca de 550 aminoácidos, tem 60 kDa e é clivada por NS6-7, sendo liberada da longa poliproteína (Liu *et al*, 1995; Guo *et al*, 1999; Hansman *et al*, 2008). A porção amino-terminal de VP1 é altamente conservada, já a porção carboxi-terminal é menos conservada que a primeira. A região entre as extremidades amino- e carboxi-terminal de VP1 é hipervariável, sendo a principal responsável pela diversidade encontrada no capsídeo entre SaV (Guo *et al*, 1999).

Assim como descrito para NoV, VP1 é dividida em dois domínios, S e P. O domínio S serve de base para as projeções de P e confere simetria icosaédrica à

partícula. No entanto o domínio P de SaV é mais longo que de NoV. Os dois domínios se conectam por meio de estrutura tipo dobradiça. P1 e P2 são subdomínios de P, P2 está na porção mais externa do arco e P1 conecta S e P2 (Chen *et al*, 2004).

VP2 é considerada proteína estrutural secundária e sua função é desconhecida (Green, 2007). É proteína básica constituída por aproximadamente 165 aminoácidos, tendo cerca de 18 kDa (Liu *et al*, 1995; Guo *et al*, 1999).

1.2.3.4. Replicação viral

As interações iniciais do vírus com a célula são pouco conhecidas, no entanto reconhecimento e ligação a receptores é passo fundamental (Green *et al*, 2007).

Em estudo realizado com VLP de SaV GI e V, foi verificada sua capacidade de ligação a HBGA sintéticos e presentes na saliva humana. Ao contrário do que ocorre com NoV, não foi observada ligação das VLP de ambos G aos HBGA, tanto sintéticos quanto de saliva (Shirato-Horikoshi *et al*, 2006).

Com PoSaV-Cowden adaptada a cultivo celular, algumas informações sobre replicação viral foram obtidas. PoSaV-Cowden depende de conteúdo intestinal para replicar em cultura (Flynn & Saif, 1988). Sais biliares foram identificados como um dos componentes ativos de conteúdo intestinal a propiciar replicação viral. Assim como ocorre para MNV, a replicação de PoSaV-Cowden parece depender de mecanismo que diminua a imunidade inata para que então haja replicação viral na célula (Chang *et al*, 2004). Outra característica compartilhada poderia ser a presença de RNA subgenômico. Em ensaio de replicação *in vitro*, molécula de RNA com 2,2 kb foi identificada, sugerindo que SaV também gera RNA subgenômico durante replicação viral (Chang, 2005).

Embora outros CaV pareçam depender de pH ácido para entrar na célula (Green, 2007), isso não foi observado para PoSaV-Cowden. Em cultivo celular, não houve diferença na eficiência de replicação viral em pH 7,4 e 6,8 (Flynn & Saif, 1988).

Os mecanismos envolvidos com empacotamento do RNA viral, maturação e liberação da partícula são pouco conhecidos (Green, 2007). Os sistemas de cultivo celular e genética reversa desenvolvidos para PoSaV-Cowden são fundamentais no estudo da base molecular de replicação viral (Chang *et al*, 2005).

1.2.3.5. Diversidade genética

Os SaV apresentam grande diversidade genética (Okada *et al*, 2006) e parece haver correlação entre a classificação em G e sua antigenicidade. Esses vírus são antigenicamente distintos (Hansman *et al*, 2007b).

A diversidade genética desses vírus é provavelmente determinada por mutações pontuais e eventos de recombinação (Wang *et al*, 2005b; Jeong *et al*, 2007). Assim como ocorre com NoV, o sítio de recombinação mais frequente é a região de junção da POL com VP1. Essa região é altamente conservada entre SaV de mesmo G (Katayama *et al*, 2004; Hansman *et al*, 2005; Wang *et al*, 2005b; Phan *et al*, 2007). No entanto, houve relato de possível recombinação na região de capsídeo do PoSaV (Wang *et al*, 2005b).

Embora a grande conservação na região de junção da POL viral com VP1 possa significar que eventos de recombinação sejam mais propensos entre SaV dentro de um mesmo G (Phan *et al*, 2007), recombinação entre diferentes G já foi descrita (Hansman *et al*, 2005). A amostra recombinante apresentou maior identidade a SaV GII na região NS do genoma, mas na região estrutural foi mais semelhante a SaV GIV (Hansman *et al*, 2005).

1.2.3.6. Sapovírus porcino

PoSaV foi descrito pela primeira vez nos EUA em amostra fecal diarreica de leitão de maternidade. Partículas virais com morfologia típica da família *Caliciviridae* foram detectadas por ME. O vírus foi chamado de CaV entérico porcino Cowden (Saif *et al*, 1980). No entanto, somente no ano de 1999, com uso de técnicas moleculares, foi possível classificá-lo como membro integrante do gênero SaV (Guo *et al*, 1999).

Desde então vêm ocorrendo, de forma crescente, relatos de PoSaV em todo mundo. PoSaV foram descritos em países da Europa (Hungria, Itália e Bélgica) (Reuter *et al*, 2007; Martella *et al*, 2008a; Mauroy *et al*, 2008), América do Norte (Wang *et al*, 2005b) e América do Sul (Venezuela e Brasil) (Martínez *et al*, 2006; Barry *et al*, 2008a) e Ásia (Coreia do Sul, Japão e China) (Kim, *et al* 2006; Yin *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2008). PoSaV também foram identificado em ostras oriundas de baía nos EUA licenciados ao consumo humano (Costantini *et al*, 2006).

Os PoSaV são classificados em três G: III, VI e VII (Schuffenecker *et al*, 2001; Farkas *et al*, 2004; Wang *et al*, 2005b ; Yin *et al*, 2006). O GIII, onde se encontra o protótipo Cowden de PoSaV, é o mais comumente encontrado infectando suínos de várias faixas etárias (Kim *et al* 2006; Wang *et al* 2006; Jeong *et al*, 2007; Barry *et al*,

2008a; Martella *et al*, 2008a; Mauroy *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2008). Existem diversas amostras ainda não classificadas que provavelmente fazem parte de G ainda não descritos, ou mesmo podem ser vírus divergentes integrantes dos G já estabelecidos (Martella *et al*, 2008b). Os GVI e VII são representados pelos protótipos JJ681 e K7, respectivamente (Wang *et al*, 2005b; Yin *et al*, 2006).

Wang *et al* (2005b) descreveram pela primeira vez PoSaV recombinantes. Identificaram duas amostras (MM280 e QW270) como possíveis recombinantes, tendo, respectivamente, a região do capsídeo e junção da POL viral com VP1 como pontos de recombinação. Detectaram uma amostra (QW19) com maior identidade a HuSaV GII Mc10, C12 e Cruise ship. Com base em pequena sequência da região da POL viral, sugeriram que a amostra QW19 poderia ter origem humana e infectaria suínos de forma acidental (Wang *et al*, 2005b). Martella *et al* (2008a; 2008b) descrevem a caracterização molecular de maior região do genoma de amostra semelhante a QW19 e verificaram a origem suína desta amostra, além de confirmar sua maior identidade a HuSaV GI.

Os SaV são geneticamente diversos e eventos de recombinação ocorrem de forma frequente (Hansman *et al*, 2007a; Wang *et al*, 2007). A semelhança apresentada por PoSaV aos HuSaV sugere potencial zoonótico desses agentes e possível papel de suínos como reservatórios de vírus na sua transmissão para humanos (Wang *et al*, 2005b; Martella *et al*, 2008a; 2008b).

A frequência com que PoSaV são detectados nas fezes de suínos é variável. Na Coreia do Sul, em dois estudos realizados com objetivo de detectar PoSaV, 9% e 29% das amostras testadas foram positivas para SaV, sendo todas semelhantes ao protótipo Cowden (Kim *et al*, 2006; Jeong *et al*, 2007). Na Itália, em 33% das amostras testadas foi detectado PoSaV (Martella *et al*, 2008a). Barry *et al* (2008a; 2008b) observaram, em cinco estados brasileiros, que as amostras apresentaram 30 a 40% de positividade. Em levantamento de prevalência de PoSaV e PoNoV realizado nos EUA com suínos de diferentes idades, detectou-se prevalência de 62% de PoSaV, sendo a maioria das amostras de animais de creche recém desmamados (Wang *et al*, 2006). Essa categoria animal parece apresentar a maior frequência de detecção de PoSaV (Wang *et al*, 2006; Barry *et al*, 2008a; 2008b) e os de maternidade a menor (Wang *et al*, 2006).

Não se demonstrou até o momento relação de causalidade entre infecção por PoSaV e diarreia. A maioria dos estudos demonstra a presença do agente em fezes de animais com e sem sinais clínicos. Embora a patogenia de PoSaV-Cowden já

tenha sido estabelecida, os autores apontam a infecção por PoSaV como causa de doença (Wang *et al*, 2006; Yin *et al*, 2006; Barry *et al*, 2008a; 2008b; Martella *et al*, 2008a; Mauroy *et al*, 2008). Poucos autores afirmam que PoSaV causam GE nos suínos avaliados (Kim *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2008).

Infecção experimental de suínos gnotobióticos com PoSaV-Cowden demonstrou que esse vírus determina diarreia de intensidade moderada a grave nos animais infectados. Observou-se atrofia de vilosidades intestinais no jejuno e íleo, estabelecendo esses segmentos como os principais sítios de replicação do vírus no intestino delgado. Embora tenham sido detectadas células epiteliais das vilosidades intestinais infectadas por toda extensão do intestino delgado, só os segmentos proximais (jejuno e íleo) exibiram alterações no exame histológico (Flynn *et al*, 1988; Guo *et al*, 2001b). Não foram detectadas alterações em tecidos extra-intestinais (pulmões, baço, fígado, rins) nem em porções mais distais do intestino (íleo e cólon), mesmo em animais que apresentaram viremia. Tais evidências sugerem que o PoSaV-Cowden não se replica nestes tecidos (Guo *et al*, 2001b).

Foi desenvolvido um sistema de cultivo celular eficiente para PoSaV-Cowden. A amostra adaptada à cultura de células replica em uma linhagem contínua de células renais de suínos, necessitando de conteúdo intestinal de suínos gnotobióticos ou sais biliares para que haja replicação viral (Flynn & Saif, 1988; Chang *et al*, 2004). Além de cultivo celular, recentemente foi descrito sistema de genética reversa de PoSaV-Cowden (Chang *et al*, 2005).

Suínos são animais imprescindíveis no estudo de enteropatógenos, uma vez que seu TGI apresenta semelhanças anatômicas, fisiológicas e de resposta imune ao dos seres humanos (Cheetham *et al*, 2006). Cultivo celular de PoSaV-Cowden, sistema de genética reversa e o modelo animal para infecção de SaV são importantes métodos que trarão grande contribuição para o maior entendimento de fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus na patogenia deste agente (Chang *et al*, 2005).

1.2.4. Diagnóstico laboratorial

A ME é técnica pouco sensível, sendo necessárias para realizar detecção, aproximadamente, um milhão de partículas virais por mililitro (mL) de fezes. Detecção de SaV por ME, quando comparada à de NoV, é mais simples de ser realizada, pois apresentam morfologia característica (Green, 2007; Wang *et al*, 2007). IME normalmente aumenta a sensibilidade da técnica, além de permitir ao examinador observar morfologia e reação antígeno-anticorpo (Wang *et al*, 2007).

A técnica de RT-PCR (e suas variações) é a mais utilizada no diagnóstico de CaV entéricos. Nessa técnica os vírus podem ser detectados não só em amostras clínicas como também em amostras ambientais e de alimentos, além de objetos contaminados. As limitações estão relacionadas ao método de extração e aos iniciadores de cadeia utilizados (Green, 2007).

Muitos iniciadores de cadeia foram descritos na literatura (Atmar & Estes, 2001), e, pela alta variabilidade genética dos CaV entéricos, a região da POL é a mais utilizada para detecção por ser altamente conservada. No entanto, não há apenas uma reação que detecte a ampla variedade de CaV descritos, havendo necessidade de serem utilizados diferentes iniciadores (Vinjé *et al*, 2003; Wang *et al*, 2007).

O diagnóstico de PoNoV e PoSaV – CaV entéricos porcinos (PEC) – por RT-PCR pode ser realizado por meio de duas abordagens: 1) com uso de iniciadores desenhados especificamente para PEC e 2) com iniciadores desenhados com base em sequências humanas de CaV (Wang *et al*, 2007). A primeira utiliza diversos pares de iniciadores para detecção de PEC geneticamente distintos, sendo mais sensível que a outra. O emprego de iniciadores desenhados com base em sequências de CaV humanos propicia detecção de PEC e identificação de amostras ainda desconhecidas bem como de novos CaV. No entanto, outra técnica deve ser realizada para confirmar resultado, como, por exemplo, o sequenciamento nucleotídico (Wang *et al*, 2007).

Ensaio imunoenzimático (EIA) podem detectar tanto antígeno como anticorpo, sendo altamente específicos (Green, 2007). O desenvolvimento de VLP proporcionou grande avanço no diagnóstico de CaV por técnicas sorológicas. Embora EIA sejam utilizados em estudos soropidemiológicos de larga escala (Green, 2007), a alta especificidade que esta técnica apresenta torna-se desvantajosa em triagem de surtos por apresentar baixa sensibilidade devido à grande diversidade genética e antigênica dos CaV (de Bruin *et al*, 2006; Hansman *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007)

1.2.5. Profilaxia

Compreensão dos mecanismos de transmissão viral é essencial para realizar eficaz prevenção da infecção por estes agentes. Os CaV são altamente infecciosos e resistentes, o que dificulta seu controle no ambiente (CDC, 2006). Ações preventivas e de controle de infecção por CaV entéricos visam primariamente a

identificação da fonte causadora do surto e sua eliminação, além de medidas que evitem a disseminação da doença (Thornton *et al*, 2004; Green, 2007).

Lavagem das mãos com água e sabão, desinfecção de material contaminado, afastamento de trabalhadores doentes e convalescentes que lidam com alimentos ou criações de animais, além do isolamento de animais doentes são medidas importantes a serem tomadas (Wilhelmi *et al*, 2003; Mattison *et al*, 2007). O tratamento de água potável e de recreação é fator essencial na prevenção de doenças de veiculação hídrica, como ocorre com os CaV, em especial NoV (CDC, 2006; Green, 2007). O despejo de água residual de suinoculturas no ambiente é outra situação onde devem ser tomadas providências para minimizar a contaminação ambiental (Costantini *et al*, 2007). É importante realizar tratamento da água e verificar sua eficiência na redução microbiológica uma vez que os NoV apresentam maior resistência a cloro que outros patógenos entéricos, permanecendo estáveis em até 10 ppm de cloro (bem acima dos níveis utilizados no tratamento comum de água) (CDC, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

PEC circulam amplamente pelo mundo e sua prevalência nos rebanhos comerciais suínos brasileiros, bem como de outros países, pode ser subestimada ou desconhecida. Alguns PEC apresentam semelhança genética ou antigênica aos CaV humanos (Wang *et al*, 2005a; 2005b; Martella *et al*, 2008b) e questões a respeito da circulação desses agentes – papel que desempenham na sanidade e na criação de suínos, patogenicidade e virulência, potencial zoonótico e risco que representam à saúde pública – devem ser investigadas.

Sabe-se que os CaV entéricos humanos são importantes agentes causadores de GE. Os NoV são a principal causa de GE aguda não bacteriana em seres humanos de todas as idades tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Moreno-Espinosa *et al*, 2004). SaV causam GE principalmente em crianças até cinco anos de idade na forma de surtos ou casos esporádicos, com diarreia mais branda que NoV (Chiba *et al*, 2000; Hansman *et al*, 2007a). Já foram encontrados em seres humanos anticorpos contra NoV bovino e, em suínos, anticorpos contra HuNoV (Farkas *et al*, 2005; Widdowson *et al*, 2005a). Recentemente foi descrito um PoSaV com maior identidade a HuSaV (Martella *et al*, 2008b). Tais achados geram especulação sobre o potencial zoonótico que os PEC possam apresentar (Widdowson *et al*, 2005b; Martella *et al*, 2008b).

Muito pouco é conhecido a respeito de infecção e diversidade genética de PEC no campo (Yin *et al*, 2006). Deste modo, estudos de epidemiologia molecular de CaV entéricos animais serem de relevante importância para compreensão da epidemiologia e da evolução dos CaV humanos, o que justifica pesquisa em caracterização genética e antigênica de PEC (Radford *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2008b; Mauroy *et al.*, 2008). Assim, programas de vigilância de surtos de GE em humanos e animais devem ser realizados, pois, com isso, haverá maior entendimento da ecologia e da evolução dos CaV (Radford *et al*, 2004; Wang *et al*, 2007; Martella *et al*, 2008b).

Realizar detecção e caracterização molecular de PEC em rebanhos suínos brasileiros é essencial para se conhecer a circulação desses agentes no país e o papel que desempenham na GE humana e animal e na criação de suínos. Estudos que tragam informações sobre distribuição e frequência de detecção de PEC, características genéticas dos vírus, associação entre infecção e doença e dados epidemiológicos dos animais infectados devem ser conduzidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Realizar detecção e caracterização molecular de PEC (PoNoV e PoSaV) em amostras fecais e conteúdo intestinal de suínos criados em rebanhos do Estado do Rio de Janeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar PEC por amplificação parcial do genoma viral (região da RdRp) por RT-PCR.
- Proceder à amplificação parcial do genoma viral por RT-PCR da região codificante da proteína principal do capsídeo viral VP1 de amostras positivas para NoV e SaV.
- Sequenciar produtos de PCR obtidos e estabelecer análise filogenética comparando as sequências nucleotídicas encontradas com outras, disponíveis em bases de dados das regiões da RdRp e VP1 com objetivo de classificar as amostras em genótipos/genogrupos.
- Comparar os resultados, pela análise filogenética das duas regiões para identificar possíveis amostras recombinantes.
- Verificar associação entre infecção por PEC e presença de diarreia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Comissão de ética

O protocolo experimental intitulado “Detecção e caracterização genotípica de calicivírus em amostras fecais de suínos no Estado do Rio de Janeiro”, sob responsabilidade do Dr. José Paulo Gagliardi Leite, foi revisto e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz, licença número L-023/07) (Anexo 1).

4.2. Área de estudo e propriedades

Este estudo foi realizado no Estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Bom Jardim, Nova Iguaçu, Petrópolis, Piraí e Valença. Foram coletadas amostras em seis diferentes fazendas (A – F) e em um abatedouro fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) do Rio de Janeiro. Nele, além de suínos, são abatidos bovinos e ovinos. As suinoculturas integrantes do estudo eram todas de ciclo completo. A Figura 4.1 mostra instalações típicas de uma suinocultura desse tipo.



A) Visão panorâmica de galpão de reprodutores; B) Baias individuais com matrizes prenhes; C) Vista panorâmica do galpão maternidade; D) Baia própria para matriz em lactação; E) Creche suspensa; F) Lote de animais de recria; G) Lote de animais de terminação.

Figura 4.1: Instalações típicas de suinocultura de ciclo completo.

4.3. Amostras para análise

Utilizaram-se amostras fecais (n=245) diarreicas e não diarreicas de suínos de diferentes idades, representando as diferentes categorias animais (fases de criação) existentes em suinocultura de ciclo completo, bem como amostras de conteúdo intestinal (n=16) de animais em fase de terminação abatidos em abatedouro sob SIE (Tabela 4.1). Coletaram-se amostras no período de maio de 2007 a setembro de 2008. Fichas de identificação, contendo informações clínicas e epidemiológicas dos animais, foram anexadas às referidas amostras fecais.

Tabela 4.1: Municípios, propriedades, tipo e classificação das amostras analisadas

Município	Propriedade	Amostra diarreica	Amostra não diarreica	Amostra não classificada	Conteúdo intestinal	Total
Bom Jardim	Fazenda A	21	115	4	0	140
Nova Iguaçu	Fazenda B	0	19	0	0	19
Petrópolis	Fazenda C	1	5	0	0	6
	Fazenda D	0	4	0	0	4
	Abatedouro	NA	NA	NA	16	16
Piraí	Fazenda E	5	54	0	0	59
Valença	Fazenda F	2	15	0	0	17
Total	–	29	212	4	16	261

NA → não se aplica

Ao chegarem ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), as amostras foram registradas no banco de dados do laboratório e classificadas quanto a sua consistência, sendo consideradas diarreicas fezes de consistência líquida ou em “sopa” e não diarreicas, as de consistência normal ou pastosa. Consideraram-se diarreicas 29 amostras e 212 não diarreicas (Tabela 4.1). A classificação foi realizada sempre pelo mesmo profissional a fim de manter-se padrão de classificação. Quatro amostras fecais, assim como as amostras de conteúdo intestinal, não tiveram sua consistência classificada. Com exceção das amostras de conteúdo intestinal, que chegaram ao laboratório congeladas, todas foram mantidas sob refrigeração entre 2 a 8°C até o momento de análise.

4.4 Coleta de amostras

4.4.1. Suinoculturas

O presente trabalho foi composto por 29 amostras fecais de leitões de maternidade, 35 de creche, 35 de recria, 112 de animais em fase de terminação, 30 amostras fecais de reprodutores (matrizes, marrãs e cachaços) e quatro de animais de categoria desconhecida (não observada).

Em leitões de maternidade (a partir de quatro dias de idade) foi realizada breve contenção mecânica do animal e a coleta de fezes deu-se diretamente de sua ampola retal por meio de mão enluvada ou, em leitões jovens (até cerca de dez dias de idade), por enema, a saber:

A) A coleta por mão enluvada consistiu de retirada das fezes da ampola retal do animal com mão enluvada (luva de procedimento não estéril, lisa, de látex) e uso de lubrificante de base aquosa (K-Y[®] – Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil). A luva utilizada foi trocada a cada coleta.

B) Na coleta por enema, cerca de 15 a 20 mL de solução fisiológica não estéril foram injetados no reto do animal com auxílio de sonda uretral flexível nº 6 (em polivinil, atóxica, estéril, descartável) e seringa de 20 mL (estéril, descartável, de polipropileno) (Figura 4.2). Após injeção da solução fisiológica, o refluxo espontâneo foi coletado. A porção da sonda introduzida no reto do animal foi lubrificada com produto de base aquosa (K-Y[®] – Johnson&Johnson). Seringa e sonda uretral utilizadas foram trocadas a cada coleta.



Figura 4.2: Contenção e coleta de fezes por enema em leitão de maternidade.

Os animais de creche, recria e terminação foram contidos com auxílio de "cachimbo" (instrumento semelhante a cambão, próprio para contenção de suínos) (Figura 4.3). Como já referenciado, a coleta de fezes foi realizada por mão

enluvada, com exceção de uma amostra de animal de terminação, que teve suas fezes coletadas por enema, como descrito anteriormente.



Figura 4.3: Contenção e coleta de fezes por mão enluvada em animal de terminação.

Cento e oitenta e oito amostras individuais foram coletadas por meio de mão enluvada e dez por enema. Quando a defecação do animal era observada, suas fezes eram coletadas do chão (amostra individual, porém não coletada do reto do animal). Houve amostras fecais coletadas do chão das baias. Essas pertenciam a um grupo de animais (representando os ocupantes da baia amostrada) ou a um único animal que não teve defecação observada. Ou seja, a origem das fezes é desconhecida, são amostras compostas (“pool”). No total, foram coletadas do chão dez amostras individuais e 37 compostas.

4.4.2. Abatedouro

As amostras de conteúdo intestinal, oriundas de suínos abatidos em abatedouro sob SIE, advieram de animais “terminados” (prontos para abate). Foram coletadas após evisceração das carcaças pelo técnico da linha de abate. Não há informação sobre qual porção intestinal teve seu conteúdo coletado. Dezesesseis amostras de conteúdo intestinal desse tipo integraram o presente estudo.

4.5 Amostra controle

Amostra fecal previamente analisada e genotipada para NoV (GII.4) no LVCA (número 10942 no banco de dados do laboratório e número de acesso ao Genbank DQ857344) foi utilizada como padrão (controle positivo) nos testes realizados. Para

o controle negativo, fez-se uso de água RNase/DNase livre (Gibco™, Grand Island, EUA).

4.6. Detecção e caracterização molecular de calicivírus entéricos porcinos

4.6.1. Suspensão fecal a 20%

Tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2 foi adicionado a 5 g da amostra fecal para completar volume final de 5 mL. Seguiu-se etapa de homogeneização em vortex por 15 segundos (s) e centrifugação a 1700 x g por 20 minutos (min). Foram coletados 4 mL do sobrenadante, que foram estocados a -20°C até o momento da análise.

4.6.2. Extração do RNA viral pelo método da sílica

A extração do RNA viral foi realizada de acordo com metodologia descrita por Boom *et al* (1990), com modificações.

1) Em tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf™ de 1,5 mL foram adicionados 400 µL de suspensão fecal a 20% em 1 mL de tampão L6. Seguiu-se etapa de homogeneização em vortex por 15 s e, então, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 15 µL de sílica e, posteriormente, foi realizada homogeneização em vortex por 15 s e em agitador orbital por 20 min. Após este período, os tubos foram centrifugados (13.000 x g por 1 min) e descartou-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. O sedimento foi lavado com 1 mL de tampão L2, etanol 70% gelado e acetona PA.

2) Cada etapa de lavagem com os diferentes reagentes foi sucedida por homogeneização em vortex por 15 s, centrifugação a 13.000 x g por 1 min e descarte do sobrenadante em solução de NaOH 10N (L2) ou frasco apropriado (etanol e acetona).

3) A sílica foi seca em banho-maria a 56°C por 15 min (com tampas de banho e microtubos abertas).

4) A sílica foi ressuspensa em 60 µL de água RNaseOUT™, homogeneizada em vortex por 15 s e incubada a 56°C por 15 min.

5) Os tubos foram, então, centrifugados a 13.000 x g por 3 min.

6) 40 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para tubo tipo Eppendorf™ de 0,5 mL. O eluato foi estocado a -70°C.

4.6.3. Transcrição reversa (RT)

Procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA) com uso do kit comercial High Capacity™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) segundo

instruções do fabricante com modificações. Ao fim da extração do RNA viral, a síntese de cDNA era realizada.

Foram adicionados 10 µL do RNA viral extraído em tubo tipo Eppendorf™ de 0,5 mL. O RNA foi desnaturado a 97°C por 7 min e colocado em banho de gelo por 2 min. Ao tubo foram adicionados 40 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.1). A RT ocorreu nas seguintes condições: 25°C por 10 min, 37°C por 2 h e 85°C por 5 s. O produto foi estocado a -20°C.

Quadro 4.1: Reagentes utilizados na transcrição reversa com uso do kit High Capacity™ para obtenção de DNA complementar.

Reagentes	Volume (µL)
Tampão RT 10X	8
dNTP mix 25X (100mM)	3,2
Iniciador randômico RT 10X	8
Multi-scribe RT (50U/µL)	4
H ₂ O DNase/RNase livre (Invitrogen™)	16,8
Total mix	40
RNA	10
Total reação (mix+RNA)	50

4.6.4. Amplificação parcial da região codificante da polimerase viral

Para realizar detecção de NoV e SaV foi utilizado protocolo descrito por Jiang *et al* (1999) com adaptações (Farkas *et al*, 2004). Os iniciadores utilizados nessa reação foram desenhados com base em sequências humanas de Nov e SaV (Jiang *et al*, 1999; Farkas *et al*, 2004). São considerados iniciadores universais por detectarem ambos os gêneros de CaV entéricos.

Este protocolo foi modificado para otimizar a PCR segundo as condições de trabalho do laboratório. O Quadro 4.2 apresenta as sequências e localização no genoma dos iniciadores de cadeia e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Quadro 4.2: Lista de iniciadores de cadeia utilizados para detecção de norovírus e sapovírus.

Iniciadores	Sequência	Posição no genoma*	Região	Fragmento amplificado (pb)
p290 (+)	5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4568–4590	RdRp (ORF1)	319 pb (NoV) & 331 pb (SaV)
p290H (+)	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC			
p290I (+)	5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC			
p290J (+)	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC			
p290K (+)	5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC			
p289 (-)	5'-TGACAATGTAATCATCACCATA	4865–4886		
p289H (-)	5'-TGACGATTTTCATCATCACCATA			
p289I (-)	5'-TGACGATTTTCATCATCCCCGT			

*Posição no genoma baseada na sequência do vírus Norwalk

Em tubo tipo Eppendorf™ de 0,2 mL, 10 µL de cDNA foram adicionados a 40 µL da mistura de PCR (Quadro 4.3). A reação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 s, 49°C por 1 min e 20 s, 72°C por 1 min; última etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram armazenados a 4°C até o momento de análise por eletroforese em gel de agarose.

Quadro 4.3: Reagentes utilizados na PCR para detecção de norovírus e sapovírus.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O DNase/RNase livre*	-	26,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ *	10X	5 µL
dNTP (dATP+dTTP+dGTP+dCTP)**	2,5 mM	4 µL
MgCl ₂ *	50 mM	1 µL
Taq DNA polimerase*	5 U/µL	0,6 µL
Iniciadores p289/290*	20 µM	1,6 µL
Iniciadores p289HI*	20 µM	0,8 µL
Iniciadores p290HIJK*	20 µM	0,8 µL

* Invitrogen™; ** GIBCO BRL, Grand Island, EUA

As amostras foram analisadas por eletroforese (100 volts por 80 min) em gel de agarose (GIBCO BRL) a 2% em tampão TBE 0,5X. Cinco microlitros do corante azul de bromofenol 10X (0,3% azul de bromofenol, 65%, sacarose, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); Invitrogen™) foram adicionados a 50 µL do produto de PCR. Para identificar o tamanho do fragmento amplificado foi utilizado padrão de

massa molecular de 100 pb (GIBCO BRL). A imagem foi registrada em sistema de captura de imagem (Biolmaging Systems) utilizando o programa Labworks 4.0. Foram consideradas positivas para NoV e SaV as amostras que apresentaram fragmentos com 319 e 331 pares de bases, respectivamente.

4.6.5. Amplificação parcial da região codificante de VP1

Uma vez identificadas por PCR na região da RdRp, as amostras positivas foram então submetidas a PCR baseada na amplificação parcial de VP1 para realizar caracterização molecular por sequenciamento nucleotídico e análise filogenética dos produtos obtidos.

Sequenciamento completo da região codificante de VP1 é recomendada para realizar classificação (determinação de G e GG) de CaV entéricos (Schuffenecker *et al*, 2001; Farkas *et al*, 2004; Zheng *et al*, 2006). Vinjé *et al* (2004) descreveram reação baseada em pequena região codificante da proteína principal de capsídeo (região D) que, por meio de análise filogenética das sequências obtidas, determina o genótipo de NoV. A classificação obtida com os produtos dessa reação é semelhante à obtida pelo sequenciamento completo da ORF2 dos NoV (Vinjé *et al*, 2004).

A amplificação de NoV foi realizada segundo protocolo descrito por Vinjé *et al* (2004), que utiliza iniciadores baseados em sequências de HuNoV GII. Já a amplificação de SaV foi realizada segundo protocolo descrito por Kim *et al* (2006) com uso de iniciadores baseados na sequência do protótipo Cowden de PoSaV. Ambos protocolos foram modificados para otimizar a PCR segundo as condições do laboratório. O Quadro 4.4 apresenta as sequências, localização no genoma dos iniciadores de cadeia e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Quadro 4.4: Lista de iniciadores de cadeia utilizados para amplificação parcial do genoma de norovírus e sapovírus na região da proteína principal de capsídeo (VP1).

Vírus	Iniciadores	Sequência	Posição no genoma*	Região	Fragmento amplificado (pb)
NoV	Cap C (-)	5'-CCTTYCCAkwTCCCAYGG	6667–6684	VP1	253 pb
GII	Cap D3 (+)	5'-TGYCTYITICCHCARGAATGG	6432–6452	(ORF2)	
	Cap D1 (+)	5'-TGTCTRSTCCCCCAGGAATG	6432–6451		
SaV	PECVcapsidF (+)	5'-CTCATCAACCCTTTTGAAAC	5698–5717	VP1	757 pb
	PECVcapsidR (-)	5'-AAAGCATGATGTTGTTAGGC	6435–6454	(ORF1)	

H: A ou C ou T/U; I: inosina; K: G ou T/U; R: purina (A ou G); S: C ou G; W: A ou T/U; Y: pirimidina (C ou T/U).
*Posição no genoma baseada na sequência do vírus Lordsdale (CapC, D1, D3), e Cowden (PECVcapsidF/R).

Em tubo tipo Eppendorf™ de 0,2 mL, 10 µL de cDNA foram adicionados a 40 µL da mistura de PCR (Quadros 4.5 e 4.6). As condições em que ocorreram as reações encontram-se nos Quadros 4.5 e 4.6. Os produtos amplificados foram armazenados a 4°C até o momento de análise por eletroforese em gel de agarose.

Quadro 4.5: Reagentes utilizados na PCR para amplificação parcial da região codificante de VP1 (região D) de norovírus e condições da reação.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O DNase/RNase livre*	-	26,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ *	10X	5 µL
dNTP (dATP+dTTP+dGTP+dCTP)**	2,5 mM	4 µL
MgCl ₂ *	50 mM	1,5 µL
Taq DNA polimerase*	5 U/µL	0,3 µL
Iniciadores CapC/D1/D3*	50 µM	3 µL
Ciclo da reação → 95°C – 3 min; 40 ciclos: 94°C – 1min, 44°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 10 min.		

* Invitrogen™; ** GIBCO BRL

Quadro 4.6: Reagentes utilizados na PCR para amplificação parcial da região codificante de VP1 de sapovírus e condições da reação.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O DNase/RNase livre*	-	26,8 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ *	10X	5 µL
dNTP (dATP+dTTP+dGTP+dCTP)**	2,5 mM	4 µL
MgCl ₂ *	50 mM	1,6 µL
Taq DNA polimerase*	5 U/µL	0,6 µL
Iniciadores PECVcapsidF/R*	50 µM	2 µL
Ciclo da reação → 94°C – 3 min; 35 ciclos: 94°C – 1min, 50°C – 1 min, 72°C – 1 min; 72°C – 7 min.		

* Invitrogen™; ** GIBCO BRL

As amostras foram analisadas por eletroforese (100 volts por 80 min) em gel de agarose (GIBCO BRL) a 2% em tampão TBE 0,5X. Cinco microlitros do corante azul de bromofenol 10X (0,3% azul de bromofenol, 65%, sacarose, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); Invitrogen™) foram adicionados a 50 µL do produto de PCR. Para identificar o tamanho do fragmento foi utilizado padrão de massa molecular de 100 pb (GIBCO BRL). A imagem foi registrada em sistema de captura de imagem (Biolmaging Systems) utilizando o programa Labworks 4.0. Foram consideradas positivas para NoV e SaV, as amostras que apresentaram fragmentos com 253 e 757 pares de bases, respectivamente.

4.6.6. Sequenciamento

Os produtos obtidos por PCR foram purificados com uso do kit QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN™, Valencia, EUA) seguindo recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados em gel de agarose a 1% utilizando como padrão o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™).

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz (Otto *et al*, 2008). As amostras foram enviadas seguindo orientação da Plataforma. Brevemente: 6,5 µL de produto purificado e 3,2 pmoles (1 µL) de cada iniciador utilizado inicialmente na PCR da região da polimerase (iniciadores p289, p290) e da região de VP1 (NoV: iniciadores CapC, CapD1 e CapD3; SaV: PECVCapsidF e PECVCapsidR) foram adicionados em tudo Eppendorf™ de 1,5 mL e entregues à Plataforma. As sequências foram enviadas por correio eletrônico.

4.6.7. Análise filogenética

O programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) foi utilizado no alinhamento de sequências obtidas e sequências protótipo resgatadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>).

A análise filogenética das sequências foi realizada utilizando o programa MEGA versão 4 (Tamura *et al*, 2007), a distância genética calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros (nucleotídeo) ou correção de Poisson (aminoácido) utilizando o método neighbor-joining com bootstrap de 2000 réplicas.

4.7. Análise estatística

Resultados foram analisados pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$). Este teste foi realizado para analisar frequência de detecção de NoV e SaV em relação à presença ou ausência de diarreia.

4.8. Soluções

4.8.1. Suspensão fecal

4.8.1.1. Tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2

Tris – Invitrogen [™]	1,21 g
Cloreto de Cálcio – CaCl ₂ – 0,0015M (Sigma [®] , St Louis, EUA)	0,22 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Em frasco bécher os reagentes foram adicionados, homogeneizados até completa diluição e ajustou-se o pH a 7,2 com ácido clorídrico PA antes de completar o volume final. A solução foi alíquotada, autoclavada a 121°C por 20 min e conservada a 4°C.

4.8.2. Extração pelo método da sílica

4.8.2.1. EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) 0,2M pH 8,0

EDTA (GIBCO BRL)	37,22 mg
Água destilada q.s.p.	500 mL

Ajusto-se o pH a 8,0 com hidróxido de sódio antes de completar o volume final.

4.8.2.2. Tris-HCl 0,1M pH 6,4

Tris (Invitrogen [™])	12,11 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

Ajustou-se o pH a 6,4 com ácido clorídrico PA antes de completar o volume final.

4.8.2.3. Tampão L6 (tampão de lise)

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [™])	120 g
Triton X-100 (Plus, Uppsala, Suécia)	2,6 g
EDTA 0,2M pH 8,0	22 mL
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 q.s.p	100 mL

Os reagentes foram adicionados em frasco bécher, homogeneizados com agitador magnético em banho-maria a 56°C até completa dissolução. A solução foi conservada a temperatura ambiente.

4.8.2.4. Tampão L2 (tampão de lavagem)

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [™])	120 g
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 q.s.p.	100 mL

Os reagentes foram adicionados em frasco bécher, homogeneizados com agitador magnético em banho-maria a 56°C até completa dissolução. A solução foi conservada a temperatura ambiente.

4.8.2.5. Hidróxido de sódio (NaOH) 10N (solução para desprezar tampões L2 e L6)

NaOH (SIGMA [®])	80 g
Água destilada q.s.p.	200 mL

Água destilada foi adicionada ao NaOH em frasco bécher. Seguiu-se etapa de homogeneização em banho de gelo até completa dissolução.

4.8.2.6. Sílica

Dióxido de silício (SIGMA [®])	60 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

A sílica foi homogeneizada e deixada sedimentar por 24 h. Desprezou-se 430 mL do sobrenadante por sucção e ressuspendeu-se a sílica em 500 mL de água destilada. Por 5 h foi sedimentada e desprezou-se 440 mL do sobrenadante. Foram adicionados 600 µL de ácido clorídrico a 37% para ajustar o pH a 2,0. Separaram-se alíquotas de 10 mL em frascos de cor âmbar que foram autoclavadas e estocadas à temperatura ambiente.

4.8.2.7. Água RNaseOUT™

Água RNase/DNase livre (Gibco™)	1 mL
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen™)	20 µL

4.8.3. Eletroforese em gel de agarose

4.8.3.1. Tampão TBE 10X pH 8,4 (solução estoque)

Tris (Invitrogen™)	108 g
Ácido bórico (SIGMA [®])	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

4.8.3.2. Gel de agarose a 1,0 e 2,0%

Agarose (USB, Cleveland, EUA)	1 ou 2 g
Tampão TBE 0,5X pH 8,4	100 mL

Dissolver por aquecimento no forno de microondas, resfriar, adicionar 10 µL SYBR Safe™ (Invitrogen™) e verter na cuba de eletroforese.

5. RESULTADOS

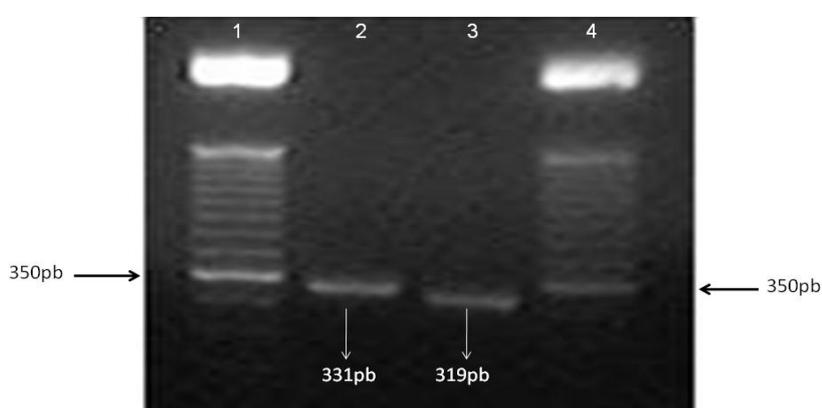
5.1. Detecção de calicivírus entéricos porcinos

Detecção de PEC foi realizada por meio de amplificação parcial da região codificante da POL viral pela técnica de RT-PCR. A Tabela 5.1 apresenta resultados de 261 amostras analisadas de acordo com sua origem. PEC foram detectados em 17,6% (46/261) das amostras analisadas. Destas, 20 (7,6%) foram positivas para PoNoV e 26 (10%) para PoSaV. PEC não foram detectados nas fazendas B e F.

Tabela 5.1: Frequência de detecção de norovírus e sapovírus porcino em 261 amostras fecais/conteúdo intestinal de suínos de propriedades localizadas no Estado do Rio de Janeiro de acordo com sua origem

Propriedade	PoNoV amostras positivas/amostras analisadas (%)	PoSaV amostras positivas/amostras analisadas (%)
Fazenda A	7/140 (5)	14/140 (10)
Fazenda B	0/19 (0)	0/19 (0)
Fazenda C	1/6 (16,7)	0/6 (0)
Fazenda D	0/4 (0)	2/4 (50)
Fazenda E	6/59 (10,2)	9/59 (15,3)
Fazenda F	0/17 (0)	0/17 (0)
Abatedouro	6/16 (37,5)	1/16 (6,3)
Total	20/261 (7,7)	26/261 (10)

Os produtos amplificados pela técnica de RT-PCR das amostras positivas para PEC podem ser observados na Figura 5.1.



Legenda: Linha 1 – marcador de massa molecular 50 pb (GIBCO BRL™); linha 2 – amostra positiva para sapovírus; linha 3 – amostra positiva para norovírus; linha 4 – marcador de massa molecular 50pb (GIBCO BRL™).

Figura 5.1: Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos de RT-PCR.

PEC foram detectados em todas as categorias (fases de criação) de animais destinados ao abate, não tendo sido encontrado nenhum animal reprodutor infectado. PoNoV foi detectado exclusivamente em animais de recria e terminação, sendo o maior número de casos de infecção de animais em fase de terminação (19/128 – 14,8%). PoSaV foi encontrado em amostras de animais de maternidade, creche, recria e terminação, sendo os animais de maternidade os com maior frequência de detecção (7/29 – 24,1%) (Tabela 5.2). Uma amostra de animal de categoria desconhecida foi positiva para PoSaV.

Tabela 5.2: Frequência observada, segundo as fases de criação dos animais, de casos de infecção por calicivírus entéricos porcinos em suínos de propriedades localizadas no Estado do Rio de Janeiro

Fase de criação	PoNoV amostras positivas/amostras analizadas (%)	PoSaV amostras positivas/amostras analizadas (%)
Maternidade	0/29 (0)	7/29 (24,1)
Creche	0/35 (0)	8/35 (22,9)
Recria	1/35 (2,9)	5/35 (14,3)
Terminação	19/128 (14,8)	5/128 (3,9)
Reprodutores	0/30 (0)	0/30 (0)
Desconhecida	0/4 (0)	1/4 (25)
Total	20/261 (7,6)	26/261 (10)

De 14 amostras fecais positivas para PoNoV, nenhuma foi classificada como diarreica. Seis não tiveram consistência avaliada por serem amostras de conteúdo intestinal. De 25 amostras fecais positivas para PoSaV, apenas duas (8%) foram consideradas diarreicas, sendo uma de animal de creche e outra de maternidade. Uma amostra positiva de PoSaV foi de conteúdo intestinal. A distribuição de amostras positivas para PEC por categoria animal e consistência fecal pode ser observada na Figura 5.2. Infecção por PEC e presença de diarreia não mostraram estar associadas ($p > 0,05$).

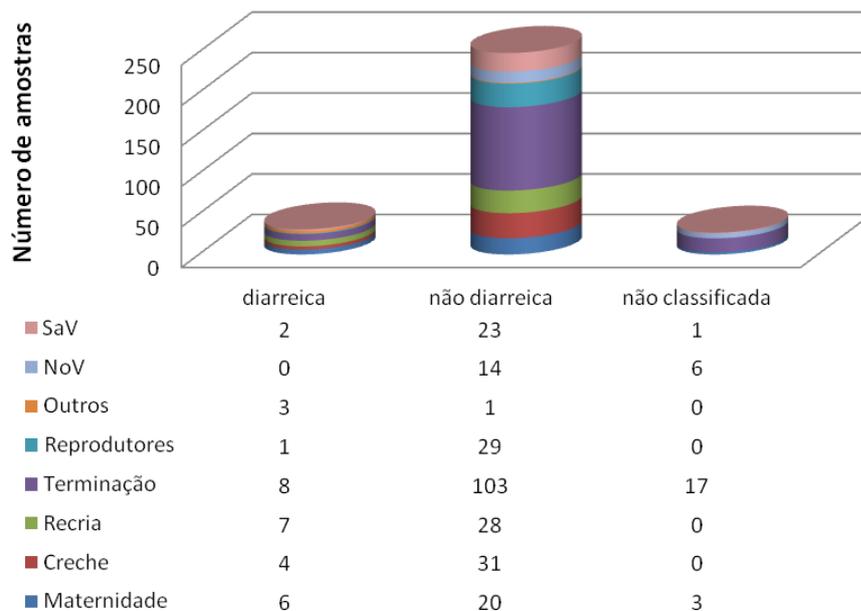
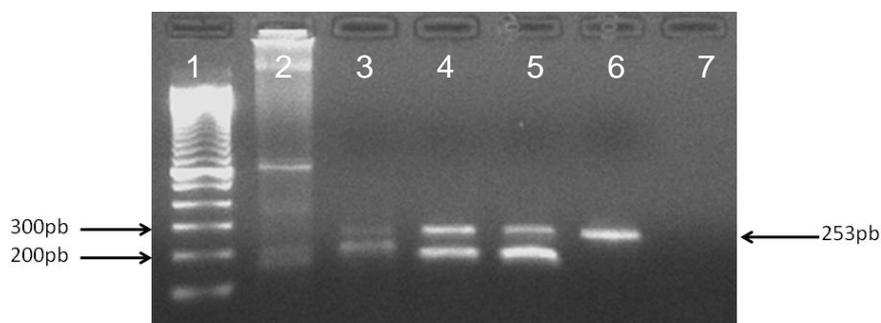


Figura 5.2: Distribuição de amostras analisadas por classificação de consistência das fezes.

5.2. Amplificação parcial da região codificante de VP1 de norovírus e sapovírus

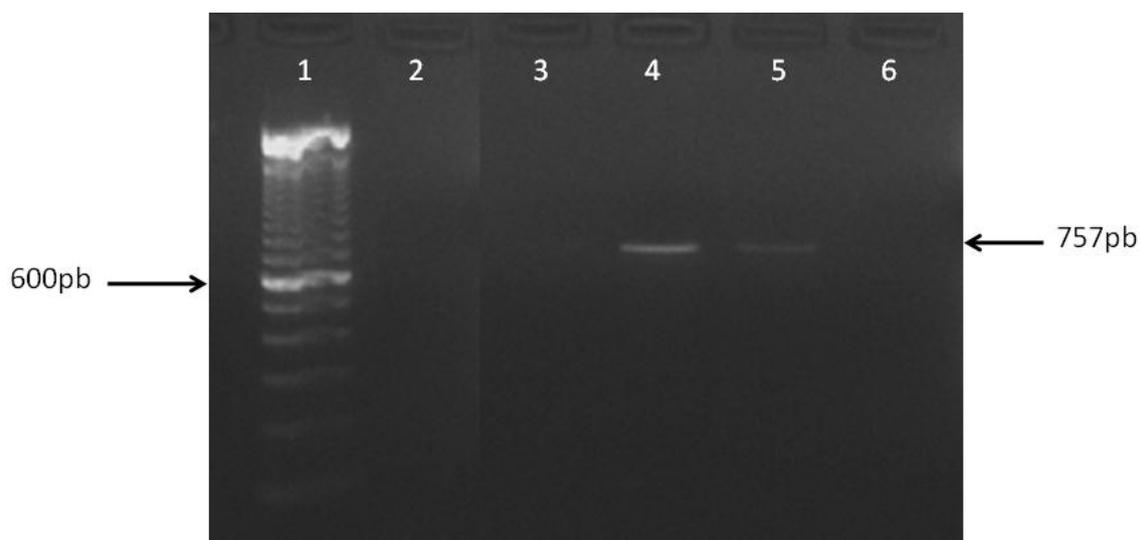
RT-PCR da região codificante da proteína principal de capsídeo de NoV (região D) foi realizada nas 20 amostras positivas, tendo dez apresentado produto amplificado de tamanho esperado (Figura 5.3).



Legenda: Linha 1 – marcador de massa molecular 100 pb (GIBCO BRL™); linha 2 – amostra negativa; linhas 3, 4 e 5 – amostras positivas; linha 6 – controle positivo da extração e RT-PCR; linha 7 – controle negativo da extração e RT-PCR.

Figura 5.3: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR.

RT-PCR da região codificante da proteína principal de capsídeo de SaV foi realizada nas 26 amostras positivas, tendo dez apresentado produto de PCR de tamanho esperado (Figura 5.4).



Legenda: Linha 1 – marcador de massa molecular 100 pb (GIBCO BRL™); linhas 2 e 3 – amostras negativas; linhas 4 e 5 – amostras positivas; linha 6 – controle negativo da extração e RT-PCR.

Figura 5.4: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR.

5.3. Caracterização molecular de calicivírus entéricos porcinos

Sequenciamento parcial do genoma viral foi realizado em todas as 46 amostras positivas para PEC detectadas por PCR da região da POL. Com objetivo de se alcançar classificação em GG/G e comparar sequências de regiões distintas do genoma viral, as amostras positivas pela PCR da região de VP1 de PoSaV e PoNoV foram sequenciadas. Nove sequências de PoSaV e seis de PoNoV da região de VP1 foram obtidas. Vinte e oito sequências da região da POL apresentaram eletroferogramas com qualidade para realizar análise filogenética (18 de PoSaV e dez de PoNoV). Na região de VP1, três sequências de cada vírus apresentaram qualidade para se realizar a análise.

Amostras cujas sequências não apresentaram eletroferogramas com picos bem definidos e que só pequena parte pôde ser analisada não foram incluídas na análise filogenética. No entanto, após edição, foram comparadas, por meio do programa computacional BLASTn, BLASTx e BLASTp, a outras sequências disponíveis nas bases de dados de nucleotídeos e proteínas de acesso público. A Tabela 5.5 apresenta o número de amostras positivas e sequências obtidas em cada etapa de caracterização molecular.

Tabela 5.3: Amostras positivas para calicivírus entéricos porcinos e sequências obtidas

	p289/290 (RdRp) – PEC	Região D – norovírus	VP1 – sapovírus
PCR	46/261	10/20	10/26
Sequenciamento	46/46	6/10	9/10
Análise filogenética	28/46	3/6	3/9

As amostras sequenciadas utilizadas nas análises filogenéticas encontram-se listadas no Quadro 5.1.

Quadro 5.1: Amostras utilizadas em análise filogenética e vírus/região do genoma correspondente com número de acesso ao GenBank.

Amostra	Vírus/Região do genoma	Nº acesso GenBank	Amostra	Vírus/Região do genoma	Nº acesso GenBank
13919	PoNoV/POL	FJ876066	13994	PoSav/POL	FJ876074
14001	PoNoV/POL	FJ876067	13995	PoSav/POL	–
14002	PoNoV/POL	–	13996	PoSav/POL	FJ876075
14003	PoNoV/POL	FJ876068	13997	PoSav/POL	FJ876076
14008	PoNoV/POL	EU921818	14000	PoSav/POL	FJ876077
15151	PoNoV/POL	FJ876069	15165	PoSav/POL	–
15205	PoNoV/POL	–	15174	PoSav/POL	–
15208	PoNoV/POL	–	15186	PoSav/POL	FJ876078
15214	PoNoV/POL	FJ876070	15218	PoSav/POL	–
15669	PoNoV/POL	–	15679	PoSav/POL	FJ876079
14008	PoNoV/VP1	EU919433	15681	PoSav/POL	FJ876080
15207	PoNoV/VP1	–	15698	PoSav/POL	FJ876081
15208	PoNoV/VP1	FJ876065	15699	PoSav/POL	–
13713	PoSav/POL	FJ876071	15700	PoSav/POL	–
13923	PoSav/POL	FJ876072	13999	PoSav/VP1	–
13924	PoSav/POL	–	14000	PoSav/VP1	–
13992	PoSav/POL	FJ876073	15186	PoSav/VP1	–

5.3.1. Análise filogenética de norovírus porcino

O sequenciamento parcial do genoma viral na região da RdRp foi realizado em dez amostras de PoNoV (Quadro 5.1) para caracterização G e GG. Análise filogenética dessas amostras em conjunto com protótipos humanos e porcinos disponíveis no GenBank identificou cinco amostras pertencentes ao GII.18 (suíno, protótipo QW125). Outras cinco formaram ramos integrantes do GII.11 (protótipo Sw918) de origem suína (Figura 5.5).

As amostras GII.18 formaram um ramo separado das amostras protótipo deste GG, no entanto relacionado a elas com alto grau de confiança (valor de “bootstrap” de 98%). O valor máximo de divergência entre elas (com base em sua sequência nucleotídica) foi de 19,2%, observado entre o protótipo (QW125) e a amostra 14002. As amostras 14001, 14003 e 14008 são idênticas na região analisada. As amostras 14001, 14002, 14003 e 14008 apresentaram maior identidade nucleotídica com vírus Havaí (protótipo GII.1 humano) que com vírus de origem suína GII.11. Estas amostras 14001, 14002, 14003 e 14008 são oriundas da mesma fazenda, sendo as três primeiras de animais da mesma baía.

As amostras pertencentes ao GII.11 formaram dois ramos separados, bem próximos um do outro e ao ramo constituído pelo protótipo Sw918. A identidade nucleotídica entre as amostras analisadas e as integrantes do GG11 variou de 82% a 86% (Tabela 5.6). As amostras 15205, 15208 e 15214 são de conteúdo intestinal de animais de abatedouro e as duas últimas são idênticas na região analisada. As amostras 15151 e 15669 são de animais em fase de terminação da mesma propriedade, no entanto, foram coletadas em ocasiões diferentes.

A identidade entre as amostras brasileiras de mesmo GG variou de 86 a 96% para as integrantes do GG11 e as do GG18, de 91 a 98%. As amostras identificadas neste estudo apresentaram divergência máxima entre elas de 34,4%.

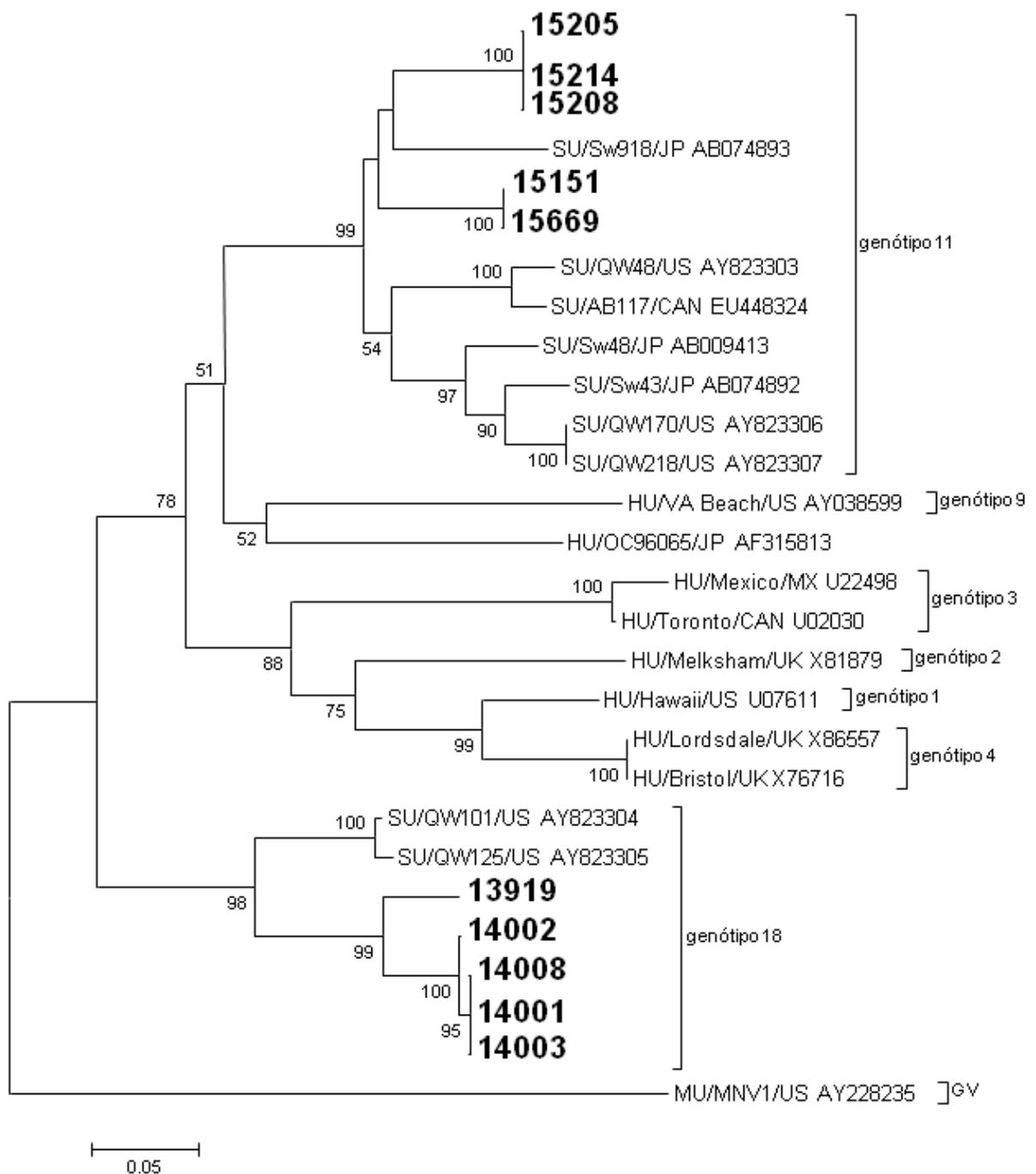


Figura 5.5: Árvore filogenética baseada na sequência de 253 nucleotídeos da região codificante da polimerase viral de norovírus. As amostras detectadas no presente estudo encontram-se em negrito. Norovírus murino (MNV1) genogrupo V – grupo externo. Valores de “bootstrap” (superiores a 50%) estão indicados nos nodos da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 5.4: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de norovírus porcino brasileiras da região da polimerase viral

	GII.1 Havaí	GII.11 Sw918	GII.11 QW170	GII.11 QW218	15151	15205	15208	15214	15669	GII.18 QW101	GII.18 QW125	13919	14001	14002	14003	14008
GII.1 Havaí		0,71	0,722	0,722	0,71	0,664	0,691	0,691	0,679	0,71	0,707	0,695	0,707	0,703	0,707	0,707
GII.11 Sw918	0,71		0,843	0,843	0,843	0,828	0,847	0,847	0,816	0,734	0,73	0,671	0,671	0,667	0,671	0,671
GII.11 QW170	0,722	0,843		1	0,855	0,816	0,835	0,835	0,828	0,722	0,718	0,656	0,66	0,656	0,66	0,66
GII.11 QW218	0,722	0,843	1		0,855	0,816	0,835	0,835	0,828	0,722	0,718	0,656	0,66	0,656	0,66	0,66
15151	0,71	0,843	0,855	0,855		0,861	0,889	0,889	0,964	0,722	0,718	0,703	0,683	0,679	0,683	0,683
15205	0,664	0,828	0,816	0,816	0,861		0,972	0,972	0,873	0,691	0,691	0,667	0,667	0,675	0,667	0,667
15208	0,691	0,847	0,835	0,835	0,889	0,972		1	0,857	0,714	0,71	0,691	0,691	0,687	0,691	0,691
15214	0,691	0,847	0,835	0,835	0,889	0,972	1		0,857	0,714	0,71	0,691	0,691	0,687	0,691	0,691
15669	0,679	0,816	0,828	0,828	0,964	0,873	0,857	0,857		0,695	0,695	0,675	0,656	0,664	0,656	0,656
GII.18 QW101	0,71	0,734	0,722	0,722	0,722	0,691	0,714	0,714	0,695		0,988	0,843	0,816	0,808	0,816	0,816
GII.18 QW125	0,707	0,73	0,718	0,718	0,718	0,691	0,71	0,71	0,695	0,988		0,839	0,812	0,808	0,812	0,812
13919	0,695	0,671	0,656	0,656	0,703	0,667	0,691	0,691	0,675	0,843	0,839		0,932	0,916	0,932	0,932
14001	0,707	0,671	0,66	0,66	0,683	0,667	0,691	0,691	0,656	0,816	0,812	0,932		0,984	1	1
14002	0,703	0,667	0,656	0,656	0,679	0,675	0,687	0,687	0,664	0,808	0,808	0,916	0,984		0,984	0,984
14003	0,707	0,671	0,66	0,66	0,683	0,667	0,691	0,691	0,656	0,816	0,812	0,932	1	0,984		1
14008	0,707	0,671	0,66	0,66	0,683	0,667	0,691	0,691	0,656	0,816	0,812	0,932	1	0,984	1	

Sequenciamento parcial do genoma viral na região D (VP1) foi realizado em três amostras de PoNoV (Quadro 5.1) para caracterização de GG e com intuito de comparar os dados obtidos nas duas regiões analisadas. Análise filogenética dessas amostras foi realizada em conjunto com protótipos humanos e porcinos de todos os 19 GG do GII. Foi observado que a amostra 15208 não manteve sua classificação como GG11, passando a agrupar com amostras GG19. As amostras protótipo desse GG são também classificadas como GG11 pela região da POL. A amostra 14008 permaneceu no mesmo GG (18). A amostra 15207 formou, em conjunto com a 15208, ramo próximo ao dos protótipos QW218 e QW170 do GG19 (Figura 5.6). A amostra 15208 apresentou maior identidade nucleotídica ao protótipo GII.5 Hillingdon (72,5%) que ao protótipo de origem porcina GII.18 QW125 (68,3%). Entre as amostras brasileiras o valor de divergência máximo encontrado (com base em sua sequência nucleotídica) foi de 33,1%. A Tabela 5.7 mostra identidade nucleotídica das amostras brasileiras quando comparadas aos protótipos de GII.5 (humano) e 11, 18 e 19 (porcinos). As amostras 15207 e 15208 são de conteúdo intestinal de animais de abatedouro.

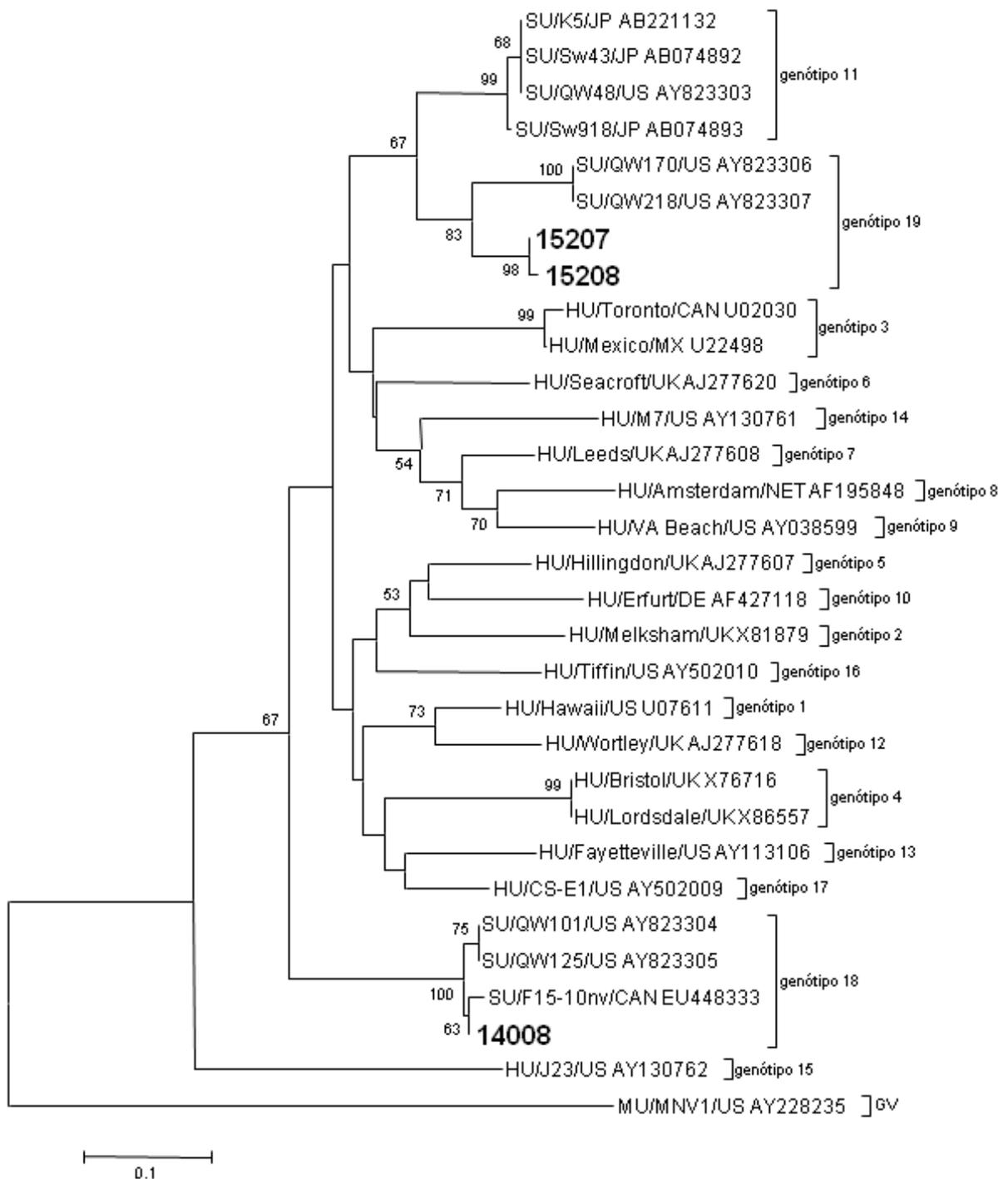


Figura 5.6: Árvore filogenética baseada na sequência de 71 aminoácidos da proteína de capsídeo VP1 de norovírus genogrupo II. As amostras detectadas no presente estudo encontram-se em negrito. Norovírus murino (MNV1) genogrupo V – grupo externo. Valores de “bootstrap” (superiores a 50%) estão indicados nos nodos da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 5.5: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de norovírus porcino brasileiras da região da proteína de capsídeo VP1

	GII.5 Hillingdon	GII.11 Sw918	GII.11 K5	GII.18 QW101	GII.18 QW125	GII.18 14008	GII.19 QW170	GII.19 QW218	GII.19 15207	GII.19 15208
GII.5 Hillingdon		0,693	0,683	0,674	0,665	0,669	0,725	0,725	0,683	0,725
GII.11 Sw918	0,693		0,851	0,716	0,72	0,72	0,734	0,734	0,72	0,767
GII.11 K5	0,683	0,851		0,683	0,679	0,669	0,772	0,772	0,716	0,767
GII.18 QW101	0,674	0,716	0,683		0,99	0,883	0,674	0,674	0,651	0,693
GII.18 QW125	0,665	0,72	0,679	0,99		0,874	0,665	0,665	0,641	0,683
GII.18 14008	0,669	0,72	0,669	0,883	0,874		0,669	0,669	0,672	0,711
GII.19 QW170	0,725	0,734	0,772	0,674	0,665	0,669		1	0,781	0,837
GII.19 QW218	0,725	0,734	0,772	0,674	0,665	0,669	1		0,781	0,837
GII.19 15207	0,683	0,72	0,716	0,651	0,641	0,672	0,781	0,781		0,934
GII.19 15208	0,725	0,767	0,767	0,693	0,683	0,711	0,837	0,837	0,934	

5.3.2. Análise filogenética de sapovírus porcino

O sequenciamento parcial do genoma viral na região da RdRp foi realizado em 18 amostras de PoSaV (Quadro 5.1) para determinação de G. Análise filogenética dessas amostras em conjunto com protótipos humanos e porcinos disponíveis no GenBank identificou sete amostras pertencentes ao GIII, representado pelo protótipo Cowden de PoSaV, e quatro ao GVII, também de origem porcina, representado pelo protótipo K7. Para sete amostras não foi possível determinar o G a qual pertencem, pois agruparam com outras ainda não classificadas (Figura 5.7).

As amostras 13924, 13992 e 13995 pertencem ao GIII e formaram ramo na árvore próximo ao da amostra brasileira BRA29-MS, apresentando 91,7% de identidade nucleotídica a ela. Apresentaram 86,7% de identidade ao protótipo Cowden de PoSaV. As amostras 13924 e 13992 são idênticas na região analisada e são provenientes de fazendas diferentes. As amostras 15165, 15186, 15679 e 15699 também foram classificadas no GIII, no entanto, são mais semelhantes à amostra americana MM280, uma possível recombinante. São oriundas da mesma suinocultura, embora coletadas em período diferente. O valor máximo de divergência apresentado entre as amostras GIII descritas neste estudo (com base em sua sequência nucleotídica) foi de 27,1% (Tabela 5.8).

As amostras 13713, 13923, 14000 e 15218 foram classificadas no GVII. Dentre elas a amostra 13713 apresentou maior identidade ao protótipo K7 (87,2%) e a mais divergente do protótipo foi a amostra 15218, com 71,6% de identidade. A última é amostra de conteúdo intestinal de animal de abatedouro. As amostras 13713 e 14000 foram coletadas na mesma fazenda em dias diferentes. O valor de divergência entre as amostras brasileiras variou entre 10,6 e 28,4% (Tabela 5.9).

As amostras 13994, 13996, 13997, 15174, 15681, 15698 e 15700 não agruparam junto a nenhuma amostra com G previamente determinado. Com exceção da amostra 15698, todas as outras formaram único grupo junto a amostras também não classificadas, como a japonesa K19 e belga PC29. O valor máximo de divergência dessas amostras foi de 30,2% e, quando comparadas a 15698, 42,1%. As amostras 13994 e 13997 são idênticas na região analisada, sendo ambas de leitões de maternidade de baias diferentes da mesma fazenda e coletadas na mesma ocasião. A amostra 15681 é de animal de terminação, da mesma propriedade e coleta da 15700, esta de animais de recria. A amostra 15698 agrupou junto a outras amostras brasileiras também não classificadas,

apresentando identidade máxima à amostra brasileira BRA04-SC (84%). Quando comparada aos protótipos de cada G de PoSaV, a maior identidade nucleotídica foi com JJ681 GVI (64,8%) (Tabela 5.10).

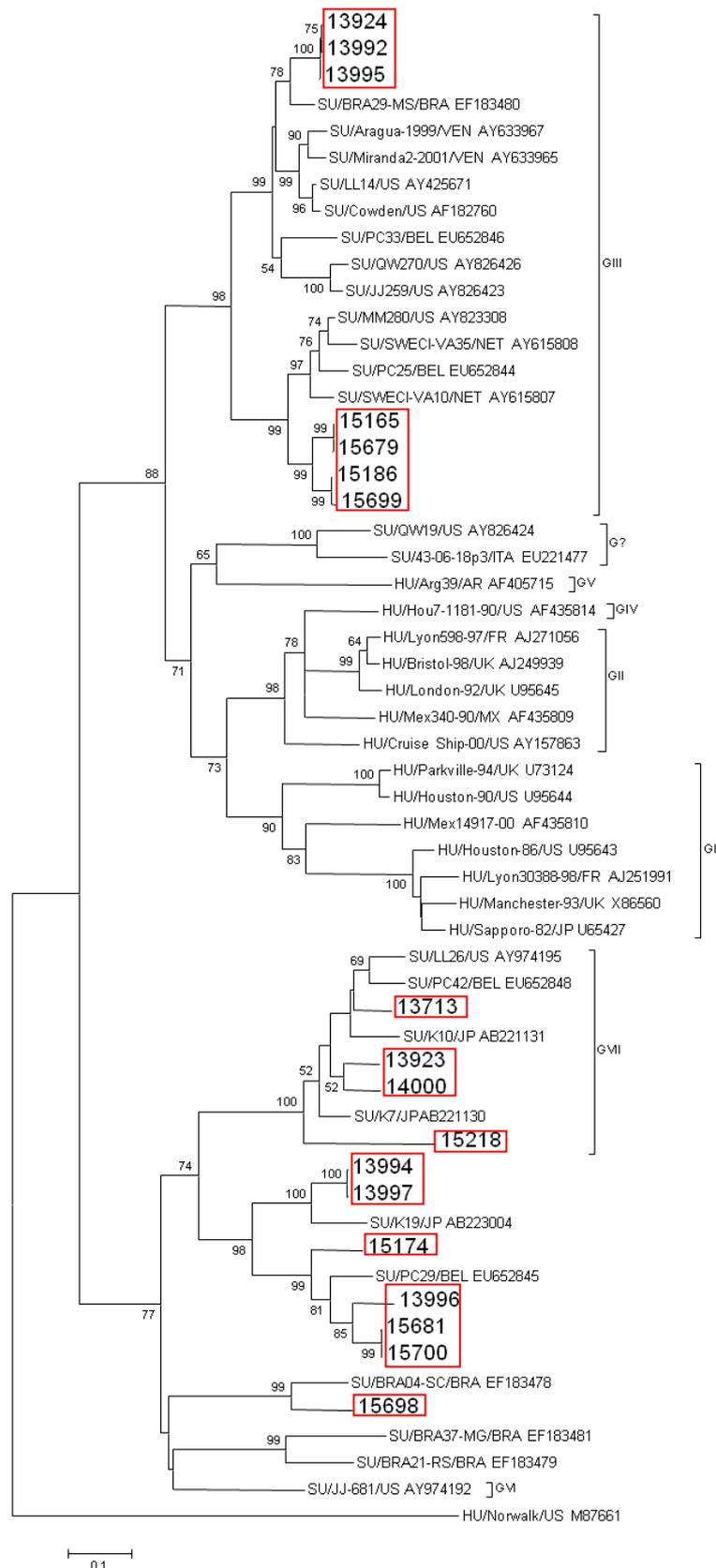


Figura 5.7: Árvore filogenética baseada na sequência de 219 nucleotídeos da região codificante da polimerase viral de sapovírus. As amostras detectadas no presente estudo encontram-se dentro de quadrados. Vírus Norwalk – grupo externo. Valores de “bootstrap” (superiores a 50%) estão indicados nos nodos da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 5.6: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo III da região da polimerase viral

	Cowden	BRA29-MS	Aragua-1999	MM280	JJ-681	K7	13924	13992	13995	15165	15186	15679	15699
Cowden		0,881	0,931	0,757	0,531	0,5	0,867	0,867	0,867	0,744	0,757	0,748	0,734
BRA29-MS	0,881		0,876	0,767	0,545	0,509	0,917	0,917	0,917	0,753	0,767	0,757	0,743
Aragua-1999	0,931	0,876		0,73	0,545	0,49	0,863	0,863	0,863	0,735	0,739	0,739	0,716
MM280	0,757	0,767	0,73		0,518	0,509	0,744	0,744	0,744	0,863	0,863	0,867	0,842
JJ-681	0,531	0,545	0,545	0,518		0,639	0,513	0,513	0,513	0,518	0,504	0,518	0,49
K7	0,5	0,509	0,49	0,509	0,639		0,518	0,518	0,518	0,49	0,477	0,49	0,472
13924	0,867	0,917	0,863	0,744	0,513	0,518		1	0,995	0,753	0,753	0,757	0,729
13992	0,867	0,917	0,863	0,744	0,513	0,518	1		0,995	0,753	0,753	0,757	0,729
13995	0,867	0,917	0,863	0,744	0,513	0,518	0,995	0,995		0,753	0,753	0,757	0,729
15165	0,744	0,753	0,735	0,863	0,518	0,49	0,753	0,753	0,753		0,936	0,995	0,909
15186	0,757	0,767	0,739	0,863	0,504	0,477	0,753	0,753	0,753	0,936		0,94	0,968
15679	0,748	0,757	0,739	0,867	0,518	0,49	0,757	0,757	0,757	0,995	0,94		0,909
15699	0,734	0,743	0,716	0,842	0,49	0,472	0,729	0,729	0,729	0,909	0,968	0,909	

Tabela 5.7: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo VII da região da polimerase viral

	Cowden	LL26	K10	K7	JJ-681	13713	13923	14000	15218
Cowden		0,472	0,472	0,5	0,531	0,486	0,49	0,477	0,468
LL26	0,472		0,867	0,863	0,621	0,872	0,853	0,885	0,735
K10	0,472	0,867		0,885	0,621	0,872	0,812	0,826	0,716
K7	0,5	0,863	0,885		0,639	0,863	0,835	0,858	0,716
JJ-681	0,531	0,621	0,621	0,639		0,607	0,621	0,639	0,557
13713	0,486	0,872	0,872	0,863	0,607		0,858	0,853	0,744
13923	0,49	0,853	0,812	0,835	0,621	0,858		0,894	0,73
14000	0,477	0,885	0,826	0,858	0,639	0,853	0,894		0,716
15218	0,468	0,735	0,716	0,716	0,557	0,744	0,73	0,716	

Tabela 5.8: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras genogrupo não classificado da região da polimerase viral

	Cowden	BRA37- MG	BRA04- -SC	LL26	K7	JJ- 681	PC29	K19	13994	13996	13997	15174	15681	15698	15700
Cowden		0,472	0,518	0,472	0,5	0,531	0,559	0,536	0,55	0,536	0,55	0,522	0,513	0,518	0,509
BRA37- MG	0,472		0,611	0,598	0,57	0,639	0,579	0,543	0,557	0,584	0,557	0,57	0,602	0,621	0,602
BRA04- SC	0,518	0,611		0,52	0,561	0,616	0,607	0,616	0,589	0,57	0,589	0,57	0,561	0,84	0,561
LL26	0,472	0,598	0,52		0,863	0,621	0,602	0,561	0,611	0,575	0,611	0,593	0,593	0,547	0,589
K7	0,5	0,57	0,561	0,863		0,639	0,621	0,616	0,63	0,575	0,63	0,616	0,575	0,579	0,57
JJ-681	0,531	0,639	0,616	0,621	0,639		0,584	0,593	0,611	0,575	0,611	0,589	0,566	0,648	0,566
PC29	0,559	0,579	0,607	0,602	0,621	0,584		0,726	0,726	0,867	0,726	0,812	0,844	0,598	0,84
K19	0,536	0,543	0,616	0,561	0,616	0,593	0,726		0,872	0,726	0,872	0,707	0,716	0,589	0,712
13994	0,55	0,557	0,589	0,611	0,63	0,611	0,726	0,872		0,698	1	0,703	0,703	0,579	0,703
13996	0,536	0,584	0,57	0,575	0,575	0,575	0,867	0,726	0,698		0,698	0,826	0,899	0,593	0,894
13997	0,55	0,557	0,589	0,611	0,63	0,611	0,726	0,872	1	0,698		0,703	0,703	0,579	0,703
15174	0,522	0,57	0,57	0,593	0,616	0,589	0,812	0,707	0,703	0,826	0,703		0,817	0,593	0,812
15681	0,513	0,602	0,561	0,593	0,575	0,566	0,844	0,716	0,703	0,899	0,703	0,817		0,598	0,995
15698	0,518	0,621	0,84	0,547	0,579	0,648	0,598	0,589	0,579	0,593	0,579	0,593	0,598		0,598
15700	0,509	0,602	0,561	0,589	0,57	0,566	0,84	0,712	0,703	0,894	0,703	0,812	0,995	0,598	

O sequenciamento parcial do genoma viral na região de VP1 foi realizado em três amostras de PoSaV (Quadro 5.1) para determinação de G e com intuito de comparar os dados obtidos nas duas regiões analisadas. Análise filogenética mostrou que todas pertencem ao GIII (Figura 5.8). Foi observado que a amostra 14000 não manteve sua classificação como GVII quando a região analisada foi da POL. A amostra 15186 permaneceu no GIII, mantendo-se próxima à amostra MM280, uma possível recombinante. Apresentou maior identidade à amostra japonesa S20 (91,5%). As amostras 13999 e 14000 formaram um grupo com amostras sul-coreanas e a amostra americana JJ259, onde o valor máximo de divergência entre elas não excedeu 21% (Tabela 5.11). A identidade entre amostras brasileiras identificadas neste estudo variou de 79 a 99,5%.

Amostras brasileiras com sequências “depositadas” no GenBank (2014P4/BRA e 2043P4/BRA) mostraram-se bastante distantes das amostras detectadas no presente estudo, com identidade máxima de 37%.

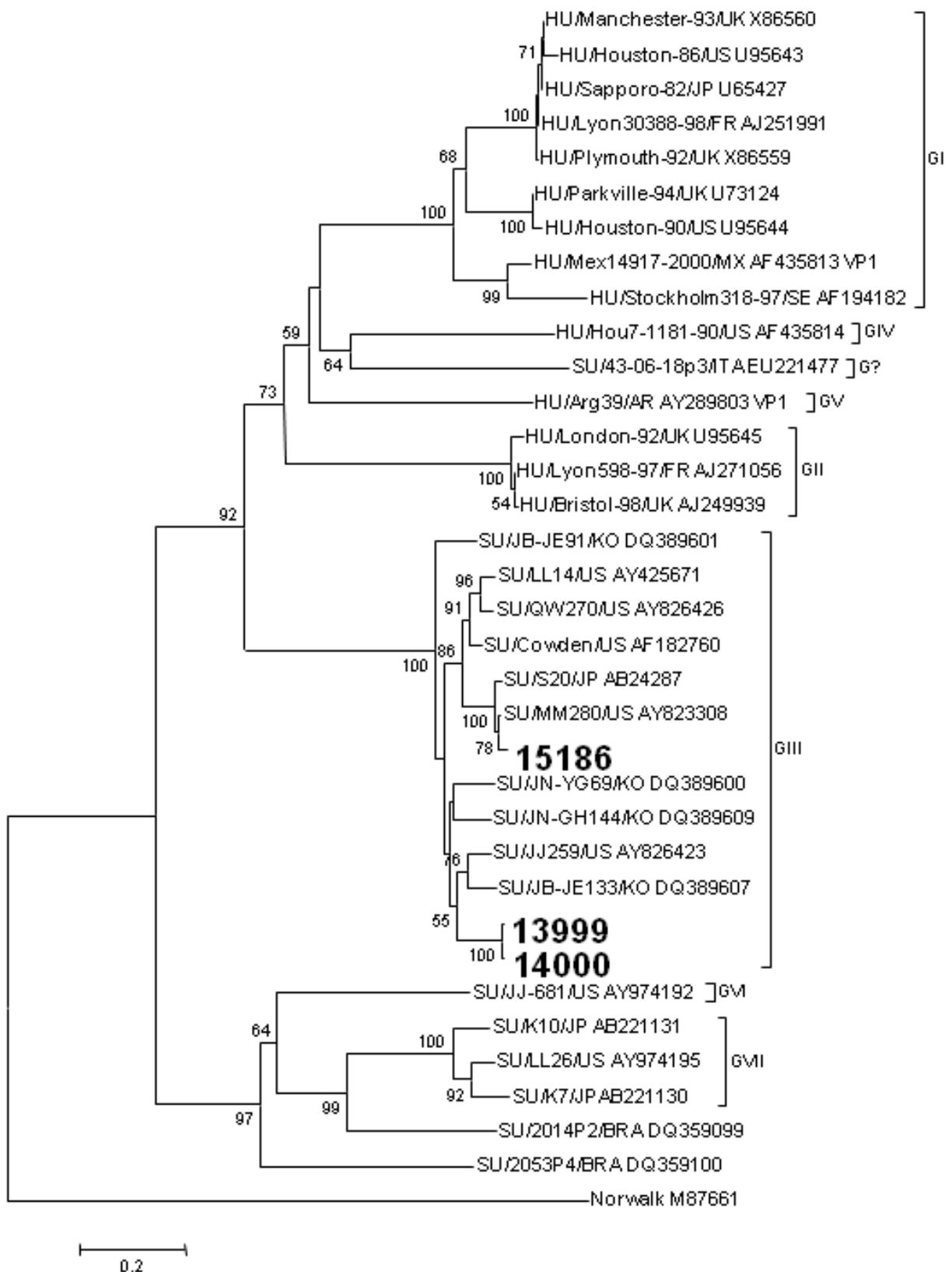


Figura 5.8: Árvore filogenética baseada na sequência de 221 aminoácidos da região codificante da proteína de capsídeo VP1 de sapovírus. As amostras detectadas no presente estudo encontram-se em negrito. Vírus Norwalk – grupo externo. Valores de “bootstrap” (superiores a 50%) estão indicados nos nodos da árvore. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Tabela 5.9: Matriz de identidade nucleotídica de amostras de sapovírus porcino brasileiras da região da proteína de capsídeo VP1

	Cowden	K7	MM280	JJ-681	JJ259	2014P2	2053P4	S20	13999	14000	15186
Cowden		0,374	0,861	0,402	0,819	0,372	0,381	0,888	0,834	0,834	0,852
K7	0,374		0,366	0,516	0,365	0,574	0,53	0,365	0,36	0,363	0,366
MM280	0,861	0,366		0,387	0,779	0,366	0,383	0,933	0,806	0,805	0,906
JJ-681	0,402	0,516	0,387		0,39	0,495	0,504	0,387	0,397	0,396	0,377
JJ259	0,819	0,365	0,779	0,39		0,353	0,372	0,79	0,837	0,837	0,773
2014P2	0,372	0,574	0,366	0,495	0,353		0,495	0,375	0,368	0,371	0,371
2053P4	0,381	0,53	0,383	0,504	0,372	0,495		0,392	0,369	0,372	0,37
S20	0,888	0,365	0,933	0,387	0,79	0,375	0,392		0,814	0,812	0,915
13999	0,834	0,36	0,806	0,397	0,837	0,368	0,369	0,814		0,995	0,791
14000	0,834	0,363	0,805	0,396	0,837	0,371	0,372	0,812	0,995		0,79
15186	0,852	0,366	0,906	0,377	0,773	0,371	0,37	0,915	0,791	0,79	

6. DISCUSSÃO

6.1 Detecção de calicivírus entéricos porcinos

No presente trabalho, detecção de PEC foi realizada por RT-PCR, baseada na amplificação parcial da região codificante da POL viral, por ser esta altamente conservada entre os membros da família *Caliciviridae*. Os iniciadores p289/290, descritos inicialmente por Jiang *et al* (1999), foram utilizados em conjunto com sua versão degenerada (p289HI/290HIJK) (Farkas *et al*, 2004). Sua sequência é baseada em amostras de NoV e SaV humanos (Jiang *et al*, 1999).

Embora sejam menos específicos para detecção de PEC que iniciadores desenhados com base em vírus de origem porcina (Wang *et al*, 2007), seu uso em associação a sequenciamento nucleotídico de produtos de PCR configura estratégia fidedigna de detecção de vírus conhecidos, amostras com alto grau de diversidade, bem como novas ou desconhecidas (Wang *et al*, 2005b; 2006).

PEC foram detectados em 17,6% das amostras analisadas. Dessas amostras, 7,6% foram positivas para PoNoV, sendo este o primeiro relato de detecção de PoNoV no Brasil. É importante ressaltar que os relatos sobre PoNoV, no mundo, apresentam variabilidade na frequência de detecção: 0,4% no Japão (Sugieda *et al*, 1998); 2% nos EUA (Wang *et al*, 2005a); 6% na Hungria (Reuter *et al*, 2007); 5% na Bélgica (Mauroy *et al*, 2008); 9% na Nova Zelândia (Wolf *et al*, 2009). Portanto, a frequência de detecção de PoNoV, neste trabalho, encontra-se dentro dos valores descritos na literatura.

A prevalência de PoNoV em rebanhos suínos no mundo é pouco conhecida. Na Holanda verificou-se prevalência de 2% de PoNoV nas amostras fecais de suínos analisadas (van der Poel *et al*, 2000). Todos os animais tinham mais de três meses de idade. Em estudo norte-americano, oito propriedades (sete fazendas e um abatedouro) foram analisadas. Embora todas as faixas etárias tenham sido avaliadas, o vírus somente foi verificado em animais em fase de recria e de terminação causando infecção assintomática. A prevalência média encontrada foi 20%, com variação entre 3 e 40% nos rebanhos com amostras positivas para PoNoV. PoNoV foram detectados em animais abatidos e em fase de recria e terminação sem sinais clínicos de GE. Tais dados corroboram trabalhos previamente realizados em diversos países (Japão, Holanda, EUA, Hungria, Bélgica

e Nova Zelândia) (Sugieda *et al*, 1998; van der Poel, 2000; Wang *et al*, 2005a; 2006; Reuter *et al*, 2007; Mauroy *et al*, 2008; Wolf *et al*, 2009).

Detectaram-se PoSaV em 10% das amostras analisadas, em todas as fases de criação de animais destinados ao abate, tanto em animais saudáveis como naqueles com sinais de GE. Animais de maternidade, creche, recria e terminação apresentaram a seguinte frequência de detecção de: 24,1%; 22,9%; 14,3% e 3,9%, respectivamente.

Note-se que a frequência de detecção de PoSaV, descrita em diferentes lugares do mundo, é variável. Na Hungria 11,8% de amostras fecais de leitões de maternidade foram positivas para PoSaV (Reuter *et al*, 2007). Na Venezuela, Martínez *et al* (2006) detectaram 17,6% de amostras positivas para PoSaV em fezes diarreicas (e não diarreicas) de animais de maternidade e creche. Já em estudos conduzidos com animais com até 28 dias de idade no Brasil, foi diagnosticada frequência de infecção de PoSaV de 44 e 30% (Barry *et al*, 2008a; 2008b). Os autores não encontraram associação entre infecção por PoSaV e diarreia. Verificaram que leitões entre 22 a 28 dias foram os mais frequentemente infectados (Barry *et al*, 2008b). Na Bélgica (Mauroy *et al*, 2008) e no Japão (Yin *et al*, 2002) verificaram-se 11,9 e 37,5% de amostras positivas para PoSaV, por intermédio de fezes diarreicas (e não diarreicas) de animais de diferentes idades. Em estudo realizado nos EUA (Wang *et al*, 2005b), foi observada prevalência de 62% de PoSaV em animais de diversas idades, com e sem sinais de GE. No presente estudo, a frequência de PoSaV observada encontra-se de acordo com a ampla variação descrita na literatura. Assim como nos trabalhos supracitados, não houve associação entre infecção por PoSaV e diarreia ($p>0,05$). No entanto, Zhang *et al* (2008) e Kim *et al* (2006) relatam ligação entre infecção por PoSaV e diarreia em leitões.

Em levantamento sorológico realizado nos EUA (71%) e Japão (36%) em suínos, verificou-se presença de anticorpos contra PoNoV, protótipo Sw918 (GII.11). Tais achados indicam ser comum infecção por NoV em suínos (Farkas *et al*, 2005). Entretanto, a ausência de sinais clínicos em animais infectados por PEC suscita dúvidas a respeito do papel que suínos possam desempenhar na infecção humana. Poderiam atuar, talvez, como reservatório para emergência de novos vírus recombinantes, híbridos humano-animal, capazes de causar infecção em seres humanos (Wang *et al*, 2006).

Há, ainda, poucas informações sobre PEC em rebanhos suínos no mundo e relatos em países em desenvolvimento são ainda mais escassos. Em decorrência, faz-se necessário vigilância epidemiológica e molecular de surtos de GE aguda em humanos e animais. Estudos sobre prevalência de PEC, impacto econômico na suinocultura e risco à saúde pública devem ser conduzidos. Publicações sobre circulação mundial desses vírus, suas características genéticas e antigênicas, patogenicidade, bem como diversidade de hospedeiros, são elementos igualmente importantes para melhor compreender a infecção por eles causada e para preveni-la de forma eficaz.

6.2. Amplificação parcial da região codificante de VP1 de calicivírus entéricos porcinos

Das amostras positivas para PoNoV por PCR da POL viral (com resultado confirmado por sequenciamento nucleotídico), 50% (10/20) foram amplificadas pela região de VP1 (região D). Os iniciadores de cadeia, utilizados na reação de amplificação da região D, apoiam-se em sequências humanas (Vinjé *et al*, 2004), sendo essa a provável razão de que nem todas as amostras positivas para PoNoV apresentem resultado positivo, devido à grande diversidade genética. Inibidores de PCR e quantidade insuficiente de RNA poderiam determinar ausência na amplificação de amostras positivas. Entretanto, para reação da região da RdRp, não houve problemas, o que torna essas causas de ocorrência pouco provável, uma vez que suspensão, RNA extraído e cDNA sintetizado eram comuns às PCR.

Na reação de amplificação da região D houve presença de bandas inespecíficas intensas e, eventualmente, em significativa quantidade. Esse seria, possivelmente, outro fator a interferir na amplificação do segmento alvo, uma vez que segmentos genômicos específicos e inespecíficos estariam competindo pelos mesmos reagentes (Wang *et al*, 2005b). O uso de iniciador específico na síntese de cDNA (o mesmo utilizado na PCR) poderia resolver ou diminuir este problema. No entanto, optou-se pela síntese de cDNA com iniciador “randômico”, pois há aumento na sensibilidade da PCR (Pang *et al*, 2005), além da diminuição de custos (o mesmo cDNA pode ser usado para diferentes PCR) e otimizar tempo.

Já a amplificação parcial do genoma viral da região codificante de VP1 de PoSaV foi obtida em 38,5% (10/26) das amostras analisadas (com resultado da PCR da POL viral previamente confirmado por sequenciamento). O provável motivo de que nem todas as amostras positivas para PoSaV apresentem resultado positivo

pode ser explicado pelo uso de somente um par de iniciadores de cadeia. Há muita diversidade genética, e a região codificante de VP1 é mais diversa que a da POL, o explicaria ausência de amplificação de amostras positivas. Os iniciadores utilizados na PCR de VP1 foram desenhados com base na sequência do protótipo Cowden – GIII (Kim *et al*, 2006). Acredita-se, então, que o uso de iniciadores baseados em sequências de PoSaV de outros G poderia resolver esse problema.

6.3. Caracterização molecular de norovírus porcino

As amostras de PoNoV, identificadas neste trabalho, são semelhantes a outras previamente descritas de PoNoV GII genótipos 11, 18 e 19.

A sequência aminoacídica completa de VP1 dos protótipos do GG18 (QW101 e QW125) apresenta maior identidade ao protótipo de origem humana México (GII.3) (Wang *et al*, 2005a). As amostras de PoNoV GG18, aqui identificadas, apresentaram, em uma pequena região da POL (253 nucleotídeos), maior identidade nucleotídica ao protótipo de origem humana Havaí (GII.1) que aos protótipos de origem porcina, confirmando a característica deste GG de ser mais próximo a amostras humanas do que aquelas de origem porcina.

O GG11 é constituído por diversas amostras, inclusive as classificadas como GG19 pela região de VP1. PoNoV GG19 apresentam sequência da POL viral semelhante às amostras GG11 e sequência nucleotídica distinta quando a região avaliada é a da proteína principal de capsídeo. A classificação em GG19, na região de VP1 e GG11 na região da POL, indica possível evento de recombinação (Wang *et al*, 2005a). A amostra 15208 foi classificada como GG11 pela região da RdRp e GG19 pela região de VP1, sendo potencialmente recombinante. Na região da POL viral, a amostra 15208 apresentou maior identidade ao protótipo GG11 Sw918 que aos protótipos GG19 QW170 e QW218. Para se determinar o real *status* de recombinante dessa amostra, será necessário amplificar fragmento único mais longo, contíguo desde a região codificante da POL até VP1, pois, pelos procedimentos metodológicos utilizados neste trabalho, não é possível excluir possibilidade dos fragmentos da região de VP1 e POL amplificados possuírem origem em vírus diferentes, causando infecção dupla no animal (Oliver *et al*, 2004).

Por outro lado, eventos de recombinação são comuns entre os HuNoV e a quebra da barreira interespecies poderia representar forma relevante de recombinação e de evolução viral (Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008), gerando novos vírus híbridos humano/animal com tropismo e virulência alterados (Mattison *et*

al, 2007). Detectar vírus animais utilizando iniciadores de cadeia baseados em sequência de vírus de origem humana favorece a identificação da ocorrência de quebra de barreira: as reações seriam mais sensíveis na detecção de vírus de origem humana (Hansman *et al*, 2005). Adotou-se aqui essa abordagem, não só na detecção, mas também na genotipagem dos PoNoV. Assim, realizar avaliação de segmento mais longo do genoma viral (da amostra identificada como possível recombinante) bem como tentativas de se amplificar outras amostras positivas poderão gerar dados importantes a respeito do potencial zoonótico desses vírus.

NoV infectam diversos mamíferos além de humanos. Recentemente foi descrito caso de recombinação entre vírus de diferentes G (Nayak *et al*, 2008). É importante manter vigilância rigorosa de NoV em animais, observando possível emergência de novos vírus com características desconhecidas.

6.4 Caracterização molecular de sapovírus porcino

As amostras de PoSaV identificadas são semelhantes a outras previamente descritas de PoSaV GIII e VII, protótipos Cowden e K7, respectivamente. No entanto, das 18 amostras analisadas na região da POL viral, sete não tiveram classificação definida. Dentro do grupo de amostras classificadas, a maioria pertence ao GIII, o que é observado na grande parte dos estudos conduzidos com PoSaV (Kim *et al* 2006; Wang *et al* 2006; Jeong *et al*, 2007; Barry *et al*, 2008a; Martella *et al*, 2008a; Mauroy *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2008).

As amostras 13923 (GVII) e 13924 (GIII) têm origem na mesma propriedade e foram coletadas na mesma ocasião. O mesmo ocorreu com as amostras: 13992, 13995 (GIII); 13994, 13996, 13997 (não classificadas); 14000 (GVII). Tal achado mostra circulação de vírus geneticamente distintos em uma mesma propriedade no mesmo período, confirmando ampla diversidade genética apresentada pelos PoSaV.

Com exceção da amostra 15698, que é mais divergente e está localizada num ramo distinto da árvore, as amostras não classificadas deste estudo agruparam com outras, previamente descritas como não classificadas, em um grande grupo sustentado por alto valor de “bootstrap”. Relatos de PoSaV “atípicos” têm sido frequentes e vem sendo proposta criação de novo G (Yin *et al*, 2006; Barry *et al*, 2008b; Martella *et al*, 2008a; Mauroy *et al*, 2008). A distância genética entre as amostras não classificadas (com base em sua sequência nucleotídica) foi de 30,2% (exceto amostra 15698).

Martella *et al* (2008a), baseados em sequência de 270 nucleotídeos de parte da região codificante da POL viral (a mesma utilizada neste estudo), determinaram os valores de distância genética de:

- 1) $\geq 50\%$ entre os diferentes gêneros integrantes da família *Caliciviridae*;
- 2) 32 a 49% entre os diferentes G do gênero SaV (distância intergenogrupo);
- 3) até 31% entre membros de um mesmo G de SaV (distância intragenogrupo).

Logo, o valor encontrado no presente estudo entre as amostras não classificadas 13994, 13997, 15174, 13996, 15681 e 15700 (30,2%) encontra-se dentro do intervalo de distância intragenogrupo proposto por Martella *et al* (2008a).

A classificação da amostra 15698 parece ser diferente das demais não classificadas. A distância mínima entre elas (com base em sua sequência nucleotídica) é de 40,2%, estando no intervalo intergenogrupo determinado por Martella *et al* (2008a). Apresenta identidade de 64,8% ao protótipo JJ681, estando mais próxima deste G que ao grupo formado pelas amostras não classificadas supracitadas. Há também maior identidade à amostra brasileira BRA04-SC (84%), categorizada como possível novo GVIII (Barry *et al*, 2008b). E, com o objetivo de estabelecer classificação da amostra 15698, segmento mais longo do genoma viral deveria ser amplificado e sequenciado, além da região codificante de VP1, a fim de se obter classificação mais fidedigna.

Para classificação de novos G, preconiza-se, então, realizar sequenciamento completo da região codificante de VP1 (Schuffenecker *et al*, 2001; Farkas *et al*, 2004). Desta forma, as amostras não classificadas aqui descritas poderiam ter seu G determinado e novos G poderiam ser identificados.

A análise filogenética conduzida na região de VP1 mostrou as três amostras sequenciadas como integrantes do GIII. A amostra 14000 foi classificada como GVII na região da POL e na região de VP1 mostrou identidade nucleotídica de 83,4% com o protótipo Cowden. Quando a região analisada foi da POL viral, sua identidade atingiu 47,7% com PoSaV-Cowden. Embora essa situação possa ser determinada por infecção dupla, a hipótese da amostra 14000 – recombinante com características de G distintos – potencializa determinadas dúvidas e gera preocupação a respeito do potencial zoonótico que os PoSaV possam ter.

Porém, embora os PoSaV sejam mais distantes dos HuSaV quando comparados aos NoV, o GIII é o mais próximo dos G humanos. Se realmente houve recombinação entre GVII (amostra 14000 na região da POL) e GIII (amostra 14000 na região de VP1), tal achado indica possibilidade de amostras de origem

suína sofrerem recombinação com amostras de origem humana, gerando novos vírus capazes de infectar humanos. Para se ter certeza que a amostra 14000 é realmente recombinante, deve-se amplificar segmento único e mais longo do genoma, abrangendo regiões da POL e VP1, com intuito de avaliar as duas regiões em um mesmo fragmento, excluindo-se possibilidade de infecção dupla.

Eventos de recombinação são comuns entre os CaV entéricos (Hansman *et al*, 2007; Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008) e a quebra de barreira interespecies pode representar um importante mecanismo de recombinação e evolução viral (Wang *et al*, 2007; Scipioni *et al*, 2008). Estudos epidemiológicos e de caracterização molecular de PEC são de suma importância para alcançarmos máxima compreensão sobre o papel que estes vírus desempenham na GE humana e animal. Sua origem, diversidade e eventos de recombinação devem ser explorados por haver possibilidade de transmissão interespecies. A grande semelhança genética apresentada por esses agentes aos CaV humanos sugere que suínos poderiam atuar como reservatórios de vírus para infecção humana.

A ausência de sinais clínicos aparentes em suínos infectados por NoV e SaV representa risco à saúde pública. Os suínos podem ser perpetuadores dos vírus no ambiente e funcionar como reservatório de vírus para emergência de recombinantes capazes de infectar seres humanos (Wang *et al*, 2006). Embora ainda não tenham tido seu papel estabelecido na diarreia de suínos, os PEC podem ter grande impacto não só na suinocultura, mas também na saúde pública.

7. CONCLUSÕES

- A frequência de infecção por PEC em rebanhos suínos fluminenses, diagnosticada no período de maio de 2007 a setembro de 2008, foi de 17,6%, sendo 7,6% para PoNoV e 10% para PoSaV. O presente estudo identificou, pela primeira vez no Brasil, circulação de PoNoV.
- PoNoV foram detectados em animais sem sinais clínicos aparentes de GE em fase de recria e terminação e em animais abatidos em abatedouro oficial.
- PoSaV foram detectados em animais com (e sem) sinais clínicos de GE em fase de maternidade, creche, recria, terminação e em um animal abatido em abatedouro oficial.
- Também os GG11, 18 e 19 de PoNoV foram identificados circulando em rebanhos suínos fluminenses, como ocorre em diversas regiões do mundo.
- As amostras de PoSaV identificadas apresentaram grande diversidade genética e pertencem, no mínimo, a dois G (GIII e GVII).
- Verificou-se também amostras não classificadas, que poderiam representar potencial G ainda não descrito.
- Duas amostras (uma de PoNoV e uma de PoSaV) foram observadas como possíveis recombinantes, apresentando classificação distinta quando as duas regiões analisadas (POL e VP1) foram comparadas.
- Não se identificou associação entre diarreia e infecção por PoNoV nos animais analisados.
- Embora tenha havido casos de animais infectados por PoSaV com sinais de GE, não se constatou associação entre infecção por PoSaV e diarreia neste estudo.

8. PERSPECTIVAS

Amplificar segmento contíguo das regiões da RdRp e VP1 com objetivo de realizar sequenciamento dos produtos obtidos e análise filogenética das duas amostras possivelmente recombinantes, bem como excluir possibilidade de infecção dupla.

Estabelecer novos protocolos de RT-PCR baseados na amplificação da região codificante de VP1 utilizando iniciadores baseados em sequências de PEC com objetivo de realizar sequenciamento nucleotídico, análise filogenética e classificação em G (PoSaV) e GG (PoNoV) das amostras que não foram amplificadas pelos protocolos utilizados neste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Estatísticas/Mundial [online]. São Paulo, Brasil; 2009. [capturado 14 jan. 2009] Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/>

Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses”. J Infect Dis 2000; 181(Suppl2):S336-48

Arya SC. Public health in less-developed countries. Lancet 2000; 356:1769. (Correspondence)

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14(1):15-37.

Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. Pesqui Vet Bras 2008a; 28(1):82-86.

Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. Vet Microbiol 2008b; 131(1-2):185-91.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Babu V, Uche U, Arnold JJ, *et al.* Norovirus Proteinase-Polymerase and Polymerase are Both Active forms of RNA-Dependent RNA Polymerase. J Virol 2005; 79(4):2393-403.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells. J Virol 2003; 77(20):10957-74.

Berke T, Matson DO. Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. Arch Virol 2000; 145:1421-36.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral

Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein. *J Virol* 2003; 77(21):11603-15.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen, CL, Wertheim-van Dillen, PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28:495-503.

Braga DF. Suinocultura – Manejo. Niterói, 2000. [Apostila da Disciplina Zootecnia – Curso de Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense].

Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus Recombination in ORF1/ORF2 Overlap. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(7):1079-85.

Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *Journal of General Virology* 2007; 88:3347–59.

Burroughs JN, Brown F. Physico-chemical Evidence for the Re-classification of the Caliciviruses. *J Gen Virol* 1974; 22:281-86.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases. Norovirus: Technical Fact Sheet [online]. Atlanta, EUA; 2006 [capturado 10 mar. 2009] Disponível em <http://www.cdc.gov/NCIDOD/DVRD/revb/gastro/norovirus-factsheet.htm>

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). PIB [online]. Piracicaba, Brasil; 2008 [capturado 14 jan. 2009] Disponível em <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>

Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot GI, Kim Y, Saif LJ, Green KY. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(23):8733-38.

Chang K-O, Sosnovtsev SS, Belliot G, Wang Q, Saif LJ, Green KY. Reverse Genetics System for Porcine Enteric Calicivirus, a Prototype Sapovirus in the *Caliciviridae*. *J Virol* 2005; 79(3):1409-16.

Cheetham S, Souza M, McGregor R, Meulia T, Wang Q, Saif LJ. Binding Patterns of Human Norovirus-Like Particles to Buccal and Intestinal Tissues of Gnotobiotic Pigs in Relation to A/H Histo-Blood Group Antigen Expression. *J Virol* 2007; 81(7):3535-44.

Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *J Virol* 2006; 80(21):10372-81.

Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, Prasad BVV. Inter- and Intragenus Structural Variations in Caliciviruses and Their Functional Implications. *J Virol* 2004; 78(12): 6469-79.

Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. Sapporo Virus: History and Recent Findings. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S303-8.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, *et al.* An Outbreak of Gastroenteritis Associated with Calicivirus in an Infant Home. *J Med Virol* 1979; 4(4):249-54.

Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* 1997; 78:291-301.

Clarke IN, Lambden PR. Organization and Expression of Calicivirus Genes. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S309-16.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Superintendência Técnica. Indicadores Rurais. Brasília, Brasil: (CNA); 2008. Boletim nº 94.

Costantini VP, Azevedo AC, Li X, Willians MC, Michel FC, Saif LJ. Effects of Different Animal Waste Treatment Technologies on Detection and Viability of Porcine Enteric Viruses. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(16):5284-91.

Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader F, Saif LJ. Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(3):1800-09.

Cubitt WD. Caliciviruses. In: Kapikian AZ, ed. *Viral Infection of the Gastrointestinal Tract*. 2^a ed. Nova Iorque: Marcel Dekker; 1994. p.549-68.

Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart CA. The expanding diversity of rotaviruses. *Lancet* 2002; 359:640-41.

de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006; 137(2): 259-264.

Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X. Seroprevalence of Noroviruses in Swine. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):657-61.

Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, *et al.* Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 2004; 149:1309–23.

Flewett TH, Davies H. Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; 1(7954):311. (Letter)

Flynn WT, Saif LJ. Serial Propagation of Porcine Enteric Calicivirus-Like Virus in Primary Porcine Kidney Cell Cultures. *J Clin Microbiol* 1988; 26(2):206-12.

Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1988; 49(6):819-25.

Fullerton SWB, Blaschke M, Coutard B, Gebhardt J, Gorbalenya A, Canard B, *et al.* Structural and Functional Characterization of Sapovirus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol* 2007; 81(4):1858-71.

Gallimore CI, Iturriza-Gomarra M, Lewis D, Cubitt D, Cotterill H, Gray JJ. Characterization of Sapoviruses Collected in the United Kingdom From 1989 to 2004. *J Med Virol* 2006; 78:673-82.

Gentsch JR, Laird AS, Bielfetl B, Griffin DD, Ba'nyai K, Ramachandran M, *et al.* Serotype Diversity and Reassortment between Human and Animal Rotavirus Strains: Implications for Rotavirus Vaccine Programs. *J Infect Dis* 2005; 192 (Suppl 1):S146–59.

Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000; 74(14): 6581-91.

Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK. Two Nonoverlapping Domains on the Norwalk Virus Open Reading Frame 3 (ORF3) Protein Are Involved in the Formation of the Phosphorylated 35K Protein and in ORF3-Capsid Protein Interactions. *J Virol* 2003; 77(6):3569-77.

Green KY. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, ed. *Fields Virology*. 5^a ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. v.1. p.949–79.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, *et al.* Taxonomy of the Caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S322-30.

Guix S, Miyuki A, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, *et al.* Norwalk Virus RNA is Infectious in Mammalian Cells. *J Virol* 2007; 81(22):12238-48.

Guo MG, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. Molecular Characterization of a Porcine Enteric Calicivirus Genetically Related to Sapporo-Like Human Caliciviruses. *J Virol* 1999; 73(11):9625-31.

Guo M, Evermann JF, Saif LJ. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 2001a; 146:479-93.

Guo M, Hayes J, Cho KO, Parwani AV, Lucas LM, Saif LJ. 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. *J Virol* 2001b; 75(19):9239-51.

Gutiérrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernandez-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(3):759-66.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-98.

Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N. Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol* 2006; 151:551-561.

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 2007a; 17:133-41.

Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 2007b; 13(10):1519-25.

Hansman GS, Oka T, Takeda N. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res* 2008; 137: 261-65.

Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund K-O, Katayama K. Intergenogroup Recombination in Sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (12):1916-20.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253(1):1-8.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menties JD. Rapid diagnosis of rotavirus by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16(3):473-77.

Holland RE. Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(4):345-75.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 2004; 12(6):279-87.

ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. *Caliciviridae* [online]. Nova Iorque, EUA; 2006 [capturado 26 jan. 2009] Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>

Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999; 83:145-54.

Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barret E, *et al.* Diagnosis of Human Caliciviruses by Use of Enzyme Immunoassays. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S349-59.

- Jeong C, Park S-I, Park S-H, Kim H-H, Park S-J, Jeong J-H, *et al.* Genetic diversity of porcine sapoviruses. *Vet Microbiol* 2007; 122:246-57.
- Kapikian AZ. The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl2):S295-302.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by Immune Electron Microcopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10(5):1075-81.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin IV HW. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* 2003 ; 229:1575-1578.
- Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 2006; 151:1291-1308.
- Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, *et al.* Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(10):1874-76.
- Kim HJ, Cho HS, Cho KO, Park NY. Detection and Molecular Characterization of Porcine Enteric Calicivirus in Korea, Genetically Related to Sapoviruses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53:155–9.
- Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:544–552.
- Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lambden PR. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 1995; 140:1345-56.
- Ludwig B, Kraus FB, Allwinn R, Doerr HW, Preiser W. Viral zoonoses – A threat under control? *Intervirology* 2003; 46:71-78.
- Madeley CR, Cosgrove BP. Caliciviruses in Man. *Lancet* 1976; 1(7952):199-200. (Letter)

Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000; 124(3):481-87.

Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Mari V, *et al.* Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. *Virus Genes* 2008a; 36(2):365-73.

Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, *et al.* Norovirus in Captive Lion Cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* 2007; 13(7):1071-73.

Martella V, Lorusso E, Banyai K, Decaro N, Corrente M, Elia G, *et al.* Identification of a Porcine Calicivirus Related Genetically to Human Sapoviruses. *J Clin Microbiol* 2008b; 46(6):1907-13.

Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo A, *et al.* Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus. *Emerg Infect Dis* 2008c; 14(8):1306-08.

Martínez MA, Alcalá AC, Carruyo G, Botero L, Liprandi F, Ludert JE. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet Microbiol* 2006; 116:77-84.

Matthews RE. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979; 12(3-5):129-296.

Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, *et al.* Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1184-88.

Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Miry C, Ziant D, Thys C, *et al.* Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol* 2008; 153(10):1927-31.

Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 2002; 147(8):1655-56.

Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human Caliciviruses and Pediatric Gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 15:237-245.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Caliciviridae*. Veterinary Virology. 3^a ed. San Diego: Academic Press; 1999. p.533-41.

Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharya R, Vinjé J, Kobayashi N, *et al*. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* 2008; 377:117-23.

Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, *et al*. Evolution of Human Calicivirus RNA In Vivo: Accumulation of Mutations in the Protruding P2 Domain of the Capsid Leads to Structural Changes and Possibly a New Phenotype. *J Virol* 2003; 77(24):13117-24.

Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Miyamura T, *et al*. Cleavage activity of the sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Arch Virol* 2005a; 150: 2539-48.

Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Ushijima H, Miyamura T, *et al*. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *J Virol* 2005b; 79(12):7283-90.

Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, *et al*. Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 2006; 87:3329-38.

Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes* 2006; 33:157-61.

Oliver SL, Brown DWG, Green J, Bridger JC. A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the *Norovirus* genus of the *Caliciviridae*. *Virology* 2004; 326:231-39.

Olives JP, Mas E. Viral acute diarrhea: clinical and evolutive aspects. *Arch Pediatr* 2007; 14:S152-55.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, *et al*. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008; 7(3):861-71.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2005; (33):168-171.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Sutmoller F, de Farias V, *et al.* Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983; 78(4):483-90.

Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, *et al.* Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol* 2007; 7:542-46.

Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science* 1999; 286(5438): 287-90.

Prasad BVV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-Dimensional Structure of Baculovirus-Expressed Norwalk Virus Capsids. *J Virol* 1994; 68(8):5117-25.

Radford AD, Gaskell RM, Hart CA. Human norovirus infection and the lessons from animal caliciviruses. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:471-78.

Reuter G, Biro H, Szucs G. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch Virol* 2007; 152:611-14.

Robel I, Gebhardt J, Mesters JR, Gorbalenya A, Coutard B, Canard B, *et al.* Functional Characterization of the Cleavage Specificity of the Sapovirus Chymotrypsin-Like Protease. *J Virol* 2008; 82(16): 8085-93.

Rohayem J, Münch J, Rethwilm A. Evidence of Recombination in the Norovirus Capsid Gene. *J Virol* 2005; 79(8):4977-4990.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigs. *J Clin Microbiol* 1980; 12(1):105-11.

Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, Lina B, Aymard M. Genetic classification of "Sapporo-like virus". *Arch Virol* 2001; 146:2115-32.

- Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J* 2008; 178:32-45.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 2007; 152:457-61.
- Silveira PR, Talamini DJD. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. *Rev CFMV* 2007; 42:11-20.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, *et al.* Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *J Virol* 2006; 80(16):7816-31.
- Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998; 143:1215-21.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596-99.
- Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 2005; 13(6):285-93.
- Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, *et al.* Murine Noroviruses Comprising a Single Genogroup Exhibit Biological Diversity despite Limited Sequence Divergence. *J Virol* 2007; 81(19): 10460–73.
- Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: Agents in Outbreaks of Acute Gastroenteritis. *Disaster Manag Response* 2004; 2(1):4-9.
- Tian P, Jiang X, Zhong W, Jensen HM, Brandl M, Bates AH, *et al.* Binding of recombinant norovirus like particle to histo-blood group antigen on cells in the lumen of pig duodenum. *Res Vet Sci* 2007; 83:410-18.
- van der Poel WH, Vinjé J, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG. Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:36-41.
- Vargas AMJ, Bortolozzo F, Wentz I, Cardoso, M. A importância dos suínos na transmissão das zoonoses – 1ª parte [online]. Porto Alegre, Brasil; 2002a.

[capturado 10 jan. 2009] Disponível em:
<http://www.suinoculturaemfoco.com.br/fd/sanidade2.php>

Vargas AMJ, Bortolozzo F, Wentz I, Cardoso M. A importância dos suínos na transmissão das zoonoses – 2ª parte [online]. Porto Alegre, Brasil; 2002b.

[capturado 10 jan. 2009] Disponível em:
http://www.suinoculturaemfoco.com.br/fd/sanidade3_1.php

Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 2004; 116:109-17.

Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff C, Hoehne M, Schreier E, *et al.* International Collaborative Study To Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1423-1433.

Wang QH, Costantini V, Saif L. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* 2007; 25:5453-5466.

Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine Noroviruses Related to Human Noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005a; 11:1874-81.

Wang QH, Han MG, Funk JA, Bowman G, Janies DA, Saif LJ. Genetic Diversity and Recombination of Porcine Sapoviruses. *J Clin Microbiol* 2005b; 43(12):5963-72.

Wang QH, Souza M, Funk JA, Zhang W, Saif LJ. Prevalence of Noroviruses and Sapoviruses in Swine of Various Ages Determined by Reverse Transcription-PCR and Microwell Hybridization Assays. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6):2057-62.

Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WHM, Vinje J, van Duynhoven YT, *et al.* Detection of Serum Antibodies to Bovine Norovirus in Veterinarians and the General Population in the Netherlands. *J Med Virol* 2005a; 76:119-28.

Widdowson MA, Stephan SM, Glass RI. Are Noroviruses Emerging? *Emerg Infect Dis* 2005b; 11(5):735-37.

Wilhelmi I, del Pozo RBM, Sánchez-Fauquier A. Rotavirus y otros virus productores de gastroenteritis aguda en la infancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26(Supl 13):61-65.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:247-62.

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, *et al.* Replication of *Norovirus* in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol* 2004; 2(12):e432.

Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, *et al.* Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol* 2009; 133(1-2):184-89.

Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 1978; 11(4):441-452.

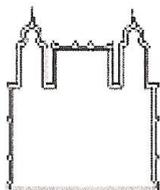
Yin Y, Tohya Y, Ogawa Y, Numazawa K, Kato K, Akashi H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Arch Virol* 2006; 151(9):1749-59.

Zhang W, Shen Q, Hua X, Cui L, Liu J, Yang S. The first Chinese porcine Sapovirus strain that contributed to an outbreak of gastroenteritis in piglets. *J Virol* 2008; 82(16):8239-40. (Letter)

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346:312-323.

10. ANEXOS

10.1. Licença CEUA



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Detecção e caracterização genotípica de calicivirus em amostras fecais de suínos no estado do Rio de Janeiro. "

número P-344/07, proposto por José Paulo Gabliardi Leite, foi licenciado pelo N° L-023/07.

Sua licença de N° L-023/07 autoriza o uso anual de :

- 300 *Sus scrofa domestica*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 16 de agosto de 2011 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

10.2. Artigo

Date: 25 Mar 2009
To: "Juliana Bragazzi Cunha" bragazzi@ioc.fiocruz.br
From: "Research in Veterinary Science" resvetsci@elsevier.com
Subject: RVSC-08-552 Revision Requested

Research in Veterinary Science

Ms. No. RVSC-08-552, "First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America"

Dear Mrs Cunha,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated your manuscript. The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication after moderate revision.

The comments listed below should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter ('Revision Note'), which is a thorough, detailed response to the referees' comments, specifically noting each comment made by the referees and/or Editor, and describing all changes. Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online:
Website: <http://ees.elsevier.com/rvsc/>
Your username is: *****

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision'.

When submitting your revised manuscript, please ensure that you upload the source files (e.g. Word). Uploading only a PDF file at this stage will create delays should your manuscript be finally accepted for publication. If your revised submission does not include the source files, we will contact you to request them.

We are looking forward to receiving the revised submission.

Kind regards,

Carmel Mathew Maria Jude
Journal Manager
Research in Veterinary Science

SHORT COMMUNICATION

First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America

J.B. Cunha*, M.C.L. de Mendonça, M.P. Miagostovich, J.P.G. Leite

Laboratory of Comparative Virology, Pav. Hélio & Peggy Pereira, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, CEP: 21040-360 - Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Corresponding Author. Tel.: 5521-25602921; Fax : 5521-25621851.

E-mail address : bragazzi@ioc.fiocruz.br (J.B. Cunha)

ABSTRACT

Human (Hu) noroviruses (NoVs) circulate worldwide infecting people of all ages in developing and developed countries. Animal NoVs present some antigenic and genetic relationship to HuNoVs, although their zoonotic potential has not been established yet. Among animal NoVs, porcine (Po) NoVs are the most similar to

HuNoVs. PoNoVs have only been detected in healthy finisher pigs in a few developed countries. Information about them lacks in developing countries. In this study 96 fecal samples from pigs of different ages from five farms in Rio de Janeiro State, Brazil were tested for NoVs. We report detection and genotyping by RT-PCR, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of partial polymerase and capsid regions of viral genome PoNoV genogroup II genotype 18 (GII.18) in one stool sample from a healthy finisher pig. This is the first report of PoNoV detection in Latin America and it supports the assumption that PoNoVs present a worldwide distribution.

Keywords: Swine; Norovirus; Asymptomatic infection

MAIN TEXT

Caliciviridae family comprises four genera: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Sapovirus* and *Norovirus*. *Lagovirus* and *Vesivirus* cause systemic diseases in animals while *Norovirus* and *Sapovirus* are enteric pathogens which can cause acute gastroenteritis (GE) in humans and animals. Human (Hu) noroviruses (NoVs) are a major cause of non-bacterial acute GE outbreaks worldwide and are commonly associated with water- and food-borne transmission. *Norovirus* genus is classified into five genogroups (I-V), which are further divided into genotypes. Genogroups (G) I, II and IV viruses infect humans; GIII infect ruminants (bovine and ovine) and GV infect mice (Scipioni et al., 2008; Wang et al., 2007).

Amongst animal NoVs, porcine noroviruses (PoNoVs) are the most closely related to HuNoVs. They are classified into GII, the prevalent G involved in GE episodes in humans (Scipioni et al., 2008). Recently a new PoNoV GII genotype 18 (GII.18) more closely related to HuNoVs was described (Wang et al., 2005). PoNoVs were detected in pigs from Japan (Wang et al., 2007), USA (Wang et al., 2005), Canada (Scipioni et al., 2008), Hungary (Reuter et al., 2007), The Netherlands (van der Poel et al., 2000), New Zealand (Wolf et al., 2007) and Belgium (Mauroy et al., 2008), suggesting a worldwide distribution of these viruses at least in developing

countries. However, HuNoVs and PoNoVs are poorly documented in developing countries. So far PoNoVs infection has been detected exclusively in subclinically infected finisher pigs (Wang et al., 2007). The purpose of this study was to report the first detection of PoNoV in a Brazilian commercial swine herd located in Rio de Janeiro State.

In this study ninety six fecal samples were obtained from five commercial swine herds in the State of Rio de Janeiro, Brazil from May to September 2007. Stool specimens were collected from the rectum of seventeen nursing pigs (older than a week old), twenty two nursery pigs (4 to 10 weeks old), thirty nine finisher pigs (10 to 26 weeks old), eleven gilts, six sows and one boar, with and without diarrhea. Epidemiological data were obtained for each animal concerning age, sex, feces consistency, history of diseases and collection date. This study was approved by Animal Care and Use Committee of Fiocruz (L-023/07).

Stool samples were resuspended in Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7.2 buffer to a final concentration of approximately 10%. These suspensions were centrifuged at 1,700 x g for 20 minutes; 400µL were used for RNA extraction according to the silica method described by Boom et al. (1990); reverse transcription was performed with random primer (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) and Superscript III enzyme (Invitrogen) following manufacturer instructions.

NoVs were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using two set of primers toward the RNA dependent RNA polymerase (RdRp) region. Primers p289/289HI (reverse primers, nucleotides – nt – 4663-4684) and p290/290HIJK (forward primers, nt 4354-4376) amplify a 319 base pairs (bp) fragment (primers positions are based on the Manchester virus genome – X86560) – Farkas et al., 2004. The other set of degenerate primers based on partial amplification of the RdRp region used in this study was described by Beuret et al.

(2002). Primers Mon431 and 432 (forward primers, nt 5093-5112) and Mon433 and 434 (reverse primers, nt 5285–5305) amplify a 213 bp fragment (primers positions are based on the Norwalk virus genome – M87661). RT-PCR using a set of degenerate primers targeting a relatively conserved region of the major capsid gene (region D) was performed in order to, by phylogenetic analysis, genotype the Brazilian strain (Vinjé et al., 2004). Primers Cap C (reverse primer, nt 6667-6684), Cap D1 and D3 (forward primers, nt 6432–6451 and 6432-6452, respectively) amplify a 253 bp fragment (primers positions are based on the Lordsdale virus genome – X86557). All procedures to avoid cross-contamination were performed, including positive (HuNoV GII.4 positive sample, GenBank accession number DQ857344) and negative (Milli-Q water) controls during all steps. One finisher pig was positive for PoNoV and showed no clinical signs.

Nucleotide sequencing was performed from amplicons obtained with p289/290/289HI/290HIJK and region D specific primers. Bands were excised from gel and purified using QIAquick gel extraction kit (QIAGEN). Sequencing reactions were performed twice on both strands with Big Dye Terminator kit and ABI Prism 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems). Sequence editing and multiple alignments were performed with BioEdit Sequence Editor 7.0 software. Nucleotide and amino acid similarity with GenBank database was assessed using BLAST tool. Phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining method and distances were calculated by using Poisson correction method (Mega v4 software). The confidence values of the internal nodes were calculated by performing bootstrap analyses with 2,000 replicates.

According to phylogenetic analysis carried out within capsid and RdRp regions, the PoNoV strain detected in this study (rj14008/07) was characterized as GII.18 (figures 1 and 2). This genotype forms a cluster between human and porcine

GII NoVs (Wang et al., 2005). Within capsid region, rj14008/07 (GenBank accession number EU919433) presented 98% of amino acid (aa) identity with GII.18 strains OH-QW101/03/US and OH-QW125/03/US. On the other hand, rj14008/07 showed lower aa identity with other porcine and human NoVs: 73% with GII.11 prototype strain Sw918/1997/JP; 71% to GII.11 strains Sw/K5/JP, OH-QW48/02/US and Sw43/1997/JP; 71% and 73% with GII.19 strains OH-QW170/03/US and OH-QW218/03/US, respectively; 70% with prototype strains Seacroft (GII.6) and Leeds (GII.7). Nevertheless, the sample here described showed 74% aa identity to HuNoV GII.1 prototype strain Hawaii and it might be more closely related to this human strain than to other PoNoVs strains belonging to genotypes 11 and 19.

In the RdRp region, rj14008/07 (GenBank accession number EU921818) presented 98% and 97% of aa identity with GII.18 strains OH-QW101/03/US and OH-QW125/03/US, respectively. However, it presented lower aa identity with other porcine and human strains: 80% with GII.11 prototype strain Sw918/1997/JP; 82% with GII.11 strains OH-QW48/02/US, OH-QW170/03/US, OH-QW218/03/US, Sw584-97J, Sw43/1997/JP, Sw48/1997/JP and IV-2/2005/HUN; 82% with human strains Lordsdale (GII.4) and Hawaii (GII.1). Nonetheless the sample detected in this study presented 85% aa identity with HuNoV strain OC96065/1996/JP.

This is the first report of PoNoV detection in a developing country and it shows PoNoV circulating among swine herds located in Rio de Janeiro State, Brazil. Our finding is of epidemiological importance and reinforces the assumption that PoNoVs have a worldwide circulation, that PoNoVs infection is found in asymptomatic finisher pigs, and that GII.18 strains share higher aa identity with HuNoVs (Wang et al., 2007).

Besides the short length of fragments amplified, PoNoV strain rj14008/07 showed high aa identity with PoNoV GII genotype 18 strains on both RdRp and main

capsid protein (VP1) regions. According to Vinjé et al. (2004) genetic classification identified by region D sequences and complete VP1 sequences is similar. Region D based RT-PCR targets a region of the NoV genome capable of genotyping strains without resorting to complete VP1 gene sequencing. Sequencing the entire virus genome or at least a larger portion is important for establishing the overall genetic relationship between the strain here described and other porcine and human strains. Larger sample numbers will be of great importance for determining PoNoVs prevalence and circulation on Brazilian swine herds. This, along with a more detailed genetic evaluation may provide important information about virus evolution, recombination and potential for zoonotic transmission.

Worldwide epidemiological studies and genotyping are extremely important for understanding the role NoVs play in human and animal GE. The origin of HuNoVs and PoNoVs, their diversity and recombination events must be explored due to the possibility of direct interspecies transmission. The presence of “human-like” NoV from pig manure has been reported, suggesting that pigs could act as virus reservoir for human infections. Recombination events are common among HuNoVs and breakage of interspecies barrier could represent an important mode of viral recombination and evolution (Wang et al., 2007, Scipioni et al., 2008).

Although PoNoVs have not had their role established in pig diarrhea, they might be of great importance not only in pig’s husbandry, but also in NoVs evolution and human infection. Up to date only few PoNoVs have been sequenced on both RdRp and capsid protein regions. Epidemiological studies must be encouraged in swine populations worldwide to evaluate their prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Vito Martella for kindly sending us the RT-PCR protocol for primers p289/290/289HI/290HIJK. JB Cunha is a recipient of scholarship from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). This study was supported by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Lüthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1925–1931.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.

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., 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* 149, 1309–1323.

Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Miry, C., Ziant, D., Thys, C., Thiry, E., 2008. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Archives of Virology* “DOI 10.1007/s00705-008-0189-4”.

Reuter, G., Biro, H., Szucs, G., 2007. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Archives of Virology* 152, 611–614.

Scipioni, A., Mauroy, A., Vinjé, J., Thiry, E., 2008. Animal noroviruses. *The Veterinary Journal* 178, 32-45.

van der Poel, W.H., Vinjé, J., van der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Koopmans, M.P.G., 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Diseases* 6, 36–41.

Vinjé, J., Hamidjaja, R.A., Sobsey, M.D., 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods* 116, 109–117.

Wang, Q.H., Han, M.G., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J.A., Saif, L.J., 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1874–1881.

Wang, Q.H., Costantini, V., Saif, L.J., 2007. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* 25, 5453–5466.

Wolf, S., Williamson, W., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., Greening, G.E., 2008. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Veterinary Microbiology* “DOI 10.1016/j.vetmic.2008.06.019”.

FIGURES

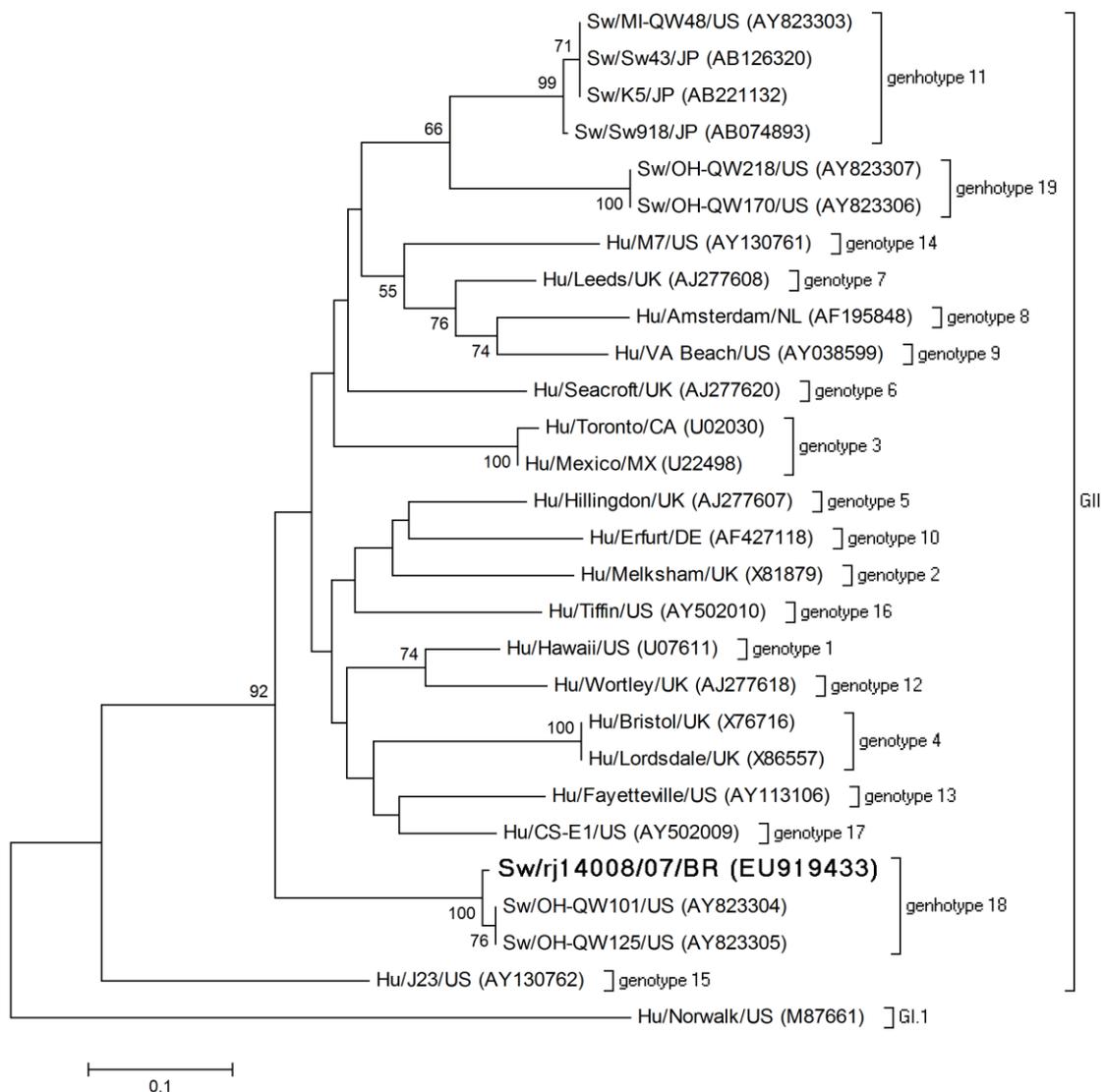


Figure 1: Neighbor-joining phylogenetic tree based on the partial capsid protein region (71 aa) of GII NoVs strains. Brazilian porcine strain is in boldface. Strains denomination: Species/Strain name/Country of origin. GenBank accession numbers are between parentheses. Bootstrap values based on 2,000 generated trees are displayed at nodes (values >50% are shown). Distances were calculated using Poisson correction method.

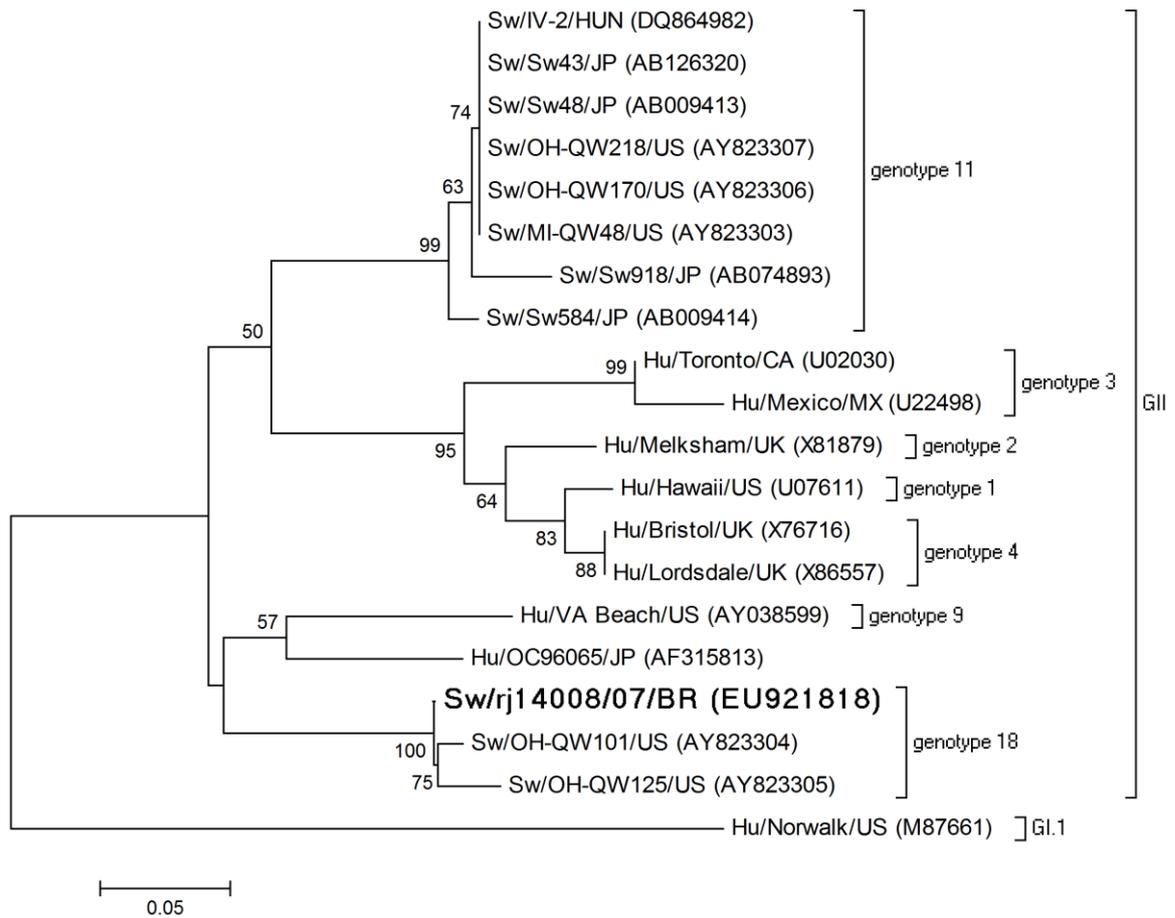


Figure 2: Neighbor-joining phylogenetic tree based on the partial RdRp region (91 aa) of GII NoVs strains. Brazilian porcine strain is in boldface. Strains denomination: Species/Strain name/Country of origin. GenBank accession numbers are between parentheses. Bootstrap values based on 2,000 generated trees are displayed at nodes (values >50% are shown). Distances were calculated using Poisson correction method.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)