



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE *SENECAVIRUS A* EM
FRAGMENTOS DE TECIDOS DE LEITÕES RECÉM-
NASCIDOS NATURALMENTE INFECTADOS**

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE *SENECAVIRUS A* EM
FRAGMENTOS DE TECIDOS DE LEITÕES RECÉM-
NASCIDOS NATURALMENTE INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal – área de concentração Sanidade
Animal – da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2018

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

Dall Agnol, Alais Maria.

ANÁLISE QUANTITATIVA DE SENECAVIRUS A EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE LEITÕES RECÉM-NASCIDOS NATURALMENTE INFECTADOS / Alais Maria Dall Agnol. - Londrina, 2018.
72 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Picornaviridae - Tese. 2. Seneca Valley virus - Tese. 3. RT-PCR quantitativa - Tese. 4. Suínos - Tese. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

ALAIS MARIA DALL AGNOL

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE *SENECA VIRUS A* EM FRAGMENTOS
DE TECIDOS DE LEITÕES RECÉM-NASCIDOS NATURALMENTE
INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal – área de concentração Sanidade
Animal – da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Caio Abércio da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo - FMVZ / USP

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

Londrina, 19 de março de 2018.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e Laboratório Multiusuário em Saúde Animal – Unidade de Biologia Molecular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri.

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

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná/SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos/MCT**

Ao meu namorado, Bruno.

Aos meus pais, Noeli e Luis (*in memoriam*),
e minha irmã, Aline.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por iluminar e guiar meu caminho, e pelas pessoas maravilhosas que colocou na minha caminhada.

A toda a minha família pelo amor e dedicação, principalmente a minha mãe, Noeli, que sempre acreditou em mim e não mediu esforços para me ajudar. Ao meu pai Luis (*in memoriam*), que mesmo não estando presente fisicamente, é fonte de inspiração e meu grande exemplo. A minha irmã Aline pelo companheirismo de sempre e aos meus avós, Josephina e Angelo, pelo apoio e incentivo, sempre estiveram presentes e confiantes nas minhas decisões.

Ao meu namorado Bruno, que esteve sempre ao meu lado, com toda sua paciência, amor e por ser meu grande companheiro. A Dirce e seu Divino que me acolhem como uma filha.

Aos professores Alice e Amauri Alfieri, pela orientação, e por serem exemplo de profissionais motivadores, pessoas e família.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Virologia Animal, obrigada pela ajuda e ensinamentos, que foram essenciais para a caminhada. Em especial a Raquel, que contribuiu imensamente para a realização deste trabalho.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, Dr.^a Elis Lorenzetti, Dr. Edsel Alves Beuttemüller e Dr. Selwyn Arlington Headley, agradeço pelo tempo, dedicação e orientações.

Às minhas amigas, Aline e Fernanda, que sempre apoiaram e incentivaram mesmo estando longe.

Muito obrigada!

“... É difícil compreender o rumo da vida em alguns momentos. Mas de uma coisa não se pode esquecer: nada é à toa. Às vezes, o melhor parece ser o pior, e o certo aparenta ser errado, mas tudo faz parte, tudo contribui ao crescimento e tem um por que. Viver vai muito além de explicações e ultrapassa todo e qualquer entendimento.”

Autor desconhecido

DALL AGNOL, Alais Maria. **Análise quantitativa de *Senecavirus A* em fragmentos de tecidos de leitões recém-nascidos naturalmente infectados**. 2018. 72f. Tese (Doutorado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Senecavirus A (SVA) é a única espécie do gênero *Senecavirus*, família *Picornaviridae*. SVA é um vírus RNA fita simples, de polaridade positiva, não envelopado e genoma com aproximadamente 7,2 kb. Desde 2007, SVA tem sido associado à doença vesicular em suínos nos Estados Unidos da América, Brasil, Colômbia, China e Tailândia. A partir de 2015, uma nova síndrome multissistêmica associada à infecção por SVA tem sido relatada em leitões recém-nascidos nesses países. SVA foi identificado por técnicas moleculares (RT-PCR, qRT-PCR e *nested*-RT-PCR), imuno-histoquímica e/ou hibridização *in situ* em diferentes órgãos de leitões recém-nascidos. Embora a RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) tenha sido utilizada para detectar RNA de SVA a partir de amostras biológicas de suínos, não há relatos da determinação da carga viral nos diferentes tecidos de leitões recém-nascidos com sinais clínicos consistentes com a infecção pelo vírus. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição tecidual e a carga viral de SVA em diferentes amostras biológicas de leitões sintomáticos, naturalmente infectados, provenientes de rebanhos suínos com histórico de doença vesicular. No primeiro estudo foi validado um teste de qRT-PCR utilizando *TaqMan* como ferramenta para a detecção e quantificação de RNA de SVA em amostras biológicas de suínos. Um conjunto de *primers* e *probe* específicos para amplificar um produto de 118 pb da região VP1 do genoma do vírus foi desenhado para ser utilizado na técnica de qRT-PCR. A avaliação da eficiência da qRT-PCR *TaqMan* foi realizada em 45 amostras de tecidos de 15 leitões sintomáticos ($n = 38$) e quatro ($n = 7$) assintomáticos previamente caracterizados como positivos ou negativos para SVA por RT-PCR convencional. Entre amostras biológicas provenientes de leitões sintomáticos, 18 (47,4%) e 30 (78,9%) foram positivas por RT-PCR convencional e qRT-PCR, respectivamente. Todas as amostras obtidas de leitões assintomáticos foram negativas para o vírus em ambas as técnicas utilizado. Os resultados demonstram que a técnica de qRT-PCR utilizando *TaqMan* padronizada neste estudo é rápida e apresenta alta sensibilidade, especificidade e repetibilidade, sendo capaz de gerar resultados confiáveis na detecção e quantificação de RNA de SVA em amostras biológicas de suínos. O segundo estudo avaliou a distribuição e a carga viral de SVA em diferentes amostras de órgãos/tecidos provenientes de leitões recém-nascidos sintomáticos. Por meio da técnica qRT-PCR previamente padronizada no primeiro estudo, foram analisados fragmentos de tronco encefálico, cerebelo, cérebro, coração, rim, fígado, pulmões, intestino delgado, baço, bexiga e tonsila provenientes de sete leitões recém-nascidos. O RNA de SVA foi detectado em 81,4% (57/70) das amostras avaliadas. A carga viral variou de 4,07 a 10,38 \log_{10} cópias genômicas/g de tecido. Os resultados demonstram que o SVA tem tropismo por diferentes órgãos em leitões recém-nascidos naturalmente infectados, principalmente tonsilas, baço, pulmão e fígado. Órgãos linfoides apresentam altas cargas virais e podem ser importantes sítios de replicação de SVA. A ampla distribuição de RNA de SVA em órgãos/tecidos dos sistemas cardiovascular, respiratório, digestório, urinário, neurológico e linfático demonstra a capacidade do vírus em causar infecção multissistêmica em leitões recém-nascidos e a sua participação nas manifestações clínicas observadas.

Palavras-chave: *Picornaviridae*. *Seneca Valley virus*. RT-PCR quantitativa. Suínos. Infecção multissistêmica.

DALL AGNOL, Alais Maria. **Quantitative analysis of *Senecavirus A* in tissue samples from naturally infected newborn piglets**. 2018. 72p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science; Concentration Area: Animal Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Senecavirus A (SVA) is the only member of the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family. SVA is a single-stranded, positive-sense, non-enveloped RNA virus with a genome size of approximately 7.2 kb. Since 2007 reports have revealed SVA-associated vesicular disease in pigs in the USA, Brazil, China, Colômbia, and Thailand. From 2015, a novel multisystemic syndrome associated with SVA infection has been reported in newborn piglets from these countries. SVA was detected by techniques such as molecular (RT-PCR, qRT-PCR and nested-RT-PCR), immunohistochemical, and/or *in situ* hybridization assays in different organs/tissues of newborn piglets. Although quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assays have been used to detect the SVA genome from organ samples of piglets, there are no reports of the SVA RNA loads in tissues of newborn piglets with clinical signs consistent with SVA infection. The aim of this study was evaluate the SVA distribution and RNA loads in different biological samples of naturally infected symptomatic piglets originating from vesicular disease-affected pig herds. In the first study a TaqMan-based qRT-PCR assay was validated for SVA RNA detection and quantification in biological porcine specimens. A set of specific primers and probe was designed to amplify a 118 bp length fragment within the VP1 gene of the SVA genome. The efficiency of TaqMan-based qRT-PCR was evaluated in 45 tissue samples of 15 symptomatic ($n = 38$) and 4 ($n = 7$) asymptomatic piglets, previously characterized as positive or negative for SVA by conventional RT-PCR. Among the biological samples of symptomatic piglets, 18 (47.4%) and 30 (78.9%) were positive for SVA in conventional RT-PCR and qRT-PCR assays, respectively. All samples obtained from asymptomatic piglets were negative for the virus in both assays. The results demonstrated that the TaqMan-based qRT-PCR assay in this study is a rapid technique with high sensitivity, specificity and reproducibility, able to generate reliable results to simultaneously detect and quantify SVA RNA in porcine biological samples. The second study determined the SVA RNA distribution and loads in different organs/tissues from symptomatic newborn piglets. Using the qRT-PCR assay previously developed in the first study, fragments of brainstem, cerebellum, cerebrum, heart, kidney, liver, lungs, small intestine, spleen, urinary bladder, and tonsils of seven newborn piglets were analyzed. SVA was detected in 81.4% (57/70) of the tissue samples. Viral loads ranged from 4.07 to 10.38 \log_{10} genomic copies/g of tissue. The results show that SVA has tropism for different organs in naturally infected newborn piglets, mainly tonsils, spleen, lungs, and liver. Lymphoid organs contained the highest viral loads and may be important sites for SVA replication. The wide SVA RNA distribution in organs/tissues of the cardiovascular, respiratory, digestive, urinary, neurological, and lymphatic systems demonstrate the virus ability to cause multisystemic infection in newborn piglets and the participation of SVA in the observed clinical manifestations.

Key words: *Picornaviridae*. *Seneca Valley virus*. Quantitative RT-PCR. Swine. Multisystemic infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1.4.1	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO <i>SENECAVIRUS A</i>	
Figura 1 –	Organização esquemática do genoma do <i>Senecavirus A</i>	18
1.4.5.1	Diagnóstico quantitativo em virologia	
Figura 2 –	Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos com os sistemas <i>TaqMan</i> e <i>SYBR Green</i>	26
3.1	Capítulo 1 - <i>SENECAVIRUS A</i> DETECTION AND QUANTIFICATION IN TISSUE SAMPLES OF NEONATAL PIGLETS BY A <i>TaqMan</i>-BASED qRT-PCR ASSAY	
Figure 1 A –	Amplification curves of <i>TaqMan</i> -based qRT-PCR assay.....	39
Figure 1 B –	Limit of detection of the conventional RT-PCR assay	39
3.2	Capítulo 2 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF <i>SENECAVIRUS A</i> IN TISSUE SAMPLES OF NATURALLY INFECTED NEWBORN PIGLETS	
Figure 1 –	Histopathological findings observed in newborn piglets naturally infected by SVA.....	44
Figure 2 –	Immunohistochemical detection of SVA antigens in newborn piglets.....	46

LISTA DE TABELAS

3.1 **Capítulo 1 - *SENECAVIRUS A* DETECTION AND QUANTIFICATION IN TISSUE SAMPLES OF NEONATAL PIGLETS BY A TaqMan-BASED qRT-PCR ASSAY**

Table 1 – Reproducibility of intra- and inter-assay qRT-PCR for *Senecavirus A* SVA detection..... 40

Table 2 – Detection of *Senecavirus A* (SVA) from different symptomatic piglet tissue samples by conventional and quantitative RT-PCR assays and quantification cycle ranges according to the tissues..... 40

3.2 **Capítulo 2 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF *SENECAVIRUS A* IN TISSUE SAMPLES OF NATURALLY INFECTED NEWBORN PIGLETS**

Table 1 – Geographical origin and age of piglets and clinical signs..... 44

Table 2 – *Senecavirus A* (SVA) antigen detection and RNA tissue quantification in different organ samples from naturally infected newborn piglets by immunohistochemistry (IHC) and TaqMan-based qRT-PCR, respectively 45

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	<i>Amino acid</i> (Aminoácido)
dpi	<i>Days post-inoculation</i> (Dias pós-inoculação)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FMD	<i>Foot-and-mouth disease</i> (Febre aftosa)
IFI	Imunofluorescência indireta
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> (Imuno-histoquímica)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (Sítio interno de entrada no ribossomo)
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PIVD	<i>Porcine idiopathic vesicular disease</i> (Doença vesicular idiopática suína)
qPCR	PCR quantitativo
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
SVA	<i>Senecavirus A</i>
SVD	<i>Swine vesicular disease</i> (Doença vesicular suína)
SVV	<i>Seneca Valley virus</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VES	<i>Vesicular exanthema of swine</i> (Exantema vesicular suíno)
VN	<i>Virus neutralization</i> (Vírus neutralização)
VPg	<i>Genome-linked protein</i> (proteína ligada ao genoma)
VS	<i>Vesicular stomatitis</i> (Estomatite vesicular)

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	
1.1	INTRODUÇÃO	15
1.2	DOENÇAS VESICULARES VIRAIS	15
1.3	FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	17
1.4	<i>SENECAVIRUS A</i>	17
1.4.1	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE <i>SENECAVIRUS A</i>	17
1.4.2	<i>SENECAVIRUS A</i> E DOENÇA VESICULAR EM SUÍNOS	19
1.4.2.1	Doença multissistêmica em leitões recém-nascidos	21
1.4.3	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	22
1.4.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ELIMINCAÇÃO VIRAL	23
1.4.5	DIAGNÓSTICO	24
1.4.5.1	Diagnóstico quantitativo em virologia	25
1.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	ARTIGOS PUBLICADOS	36
3.1	CAPÍTULO 1 A TaqMan-BASED qRT-PCR ASSAY FOR <i>SENECAVIRUS A</i> DETECTION IN TISSUE SAMPLES OF NEONATAL PIGLETS	37
	Abstract	38
	Introduction	38
	References	41
3.2	CAPÍTULO 2 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF <i>SENECAVIRUS A</i> IN TISSUE SAMPLES OF NATURALLY INFECTED NEWBORN PIGLETS	42
	Abstract	43
	Acknowledgments	47
	Ethical Approval	47
	References	47

4	CONCLUSÕES	48
5	ANEXOS	49
5.1	LISTA DE REAGENTES	50
5.2	SOLUÇÕES E TAMPÕES	53
5.3	PROTOCOLOS DE TÉCNICAS	58
5.4	LISTA DE <i>SOFTWARES</i>	72

1 REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

99

100

101 1.1 INTRODUÇÃO

102

103 O Brasil destaca-se como o quarto maior produtor e exportador de carne suína do
104 mundo. A produção de carne suína vem aumentando nos últimos anos, alcançando 3,7
105 milhões de toneladas no ano de 2016 (ABPA, 2017). Isso demonstra a grande importância
106 econômica da suinocultura para o país, envolvendo um grande número de produtores, gerando
107 muitos empregos em toda cadeia produtiva, sendo responsável pelo abastecimento interno e
108 contribuindo com as exportações. A consolidação do Brasil como grande produtor e
109 exportador de carne suína está diretamente ligada ao uso de tecnologias modernas, melhores
110 índices de produtividade e qualidade do produto, bem como à adequação às exigências dos
111 diferentes mercados importadores.

112

113 Para garantir os avanços constantes na produtividade e na qualidade da carne suína,
114 novas descobertas nas áreas da genética, nutrição, sanidade e exigências de manejo têm
115 modificado consideravelmente a suinocultura, tanto no âmbito nacional quanto mundial,
116 visando aumentar o bem-estar dos animais e reduzir o impacto ambiental sem o prejuízo da
117 produção (GUIMARÃES et al., 2017).

117

118 No entanto, com as modificações e incrementos tecnológicos inseridos no sistema de
119 produção de suínos houve maior concentração dos animais o que predispõe ao estresse, fator
120 que pode ser indiretamente responsável pela ocorrência de diversas enfermidades. Muitas
121 doenças infecciosas até então desconhecidas acabaram emergindo nos últimos anos,
122 constituindo-se em grande problema pois, apesar dos esforços de técnicos, pesquisadores e de
123 empresas públicas e privadas ligados à suinocultura, ocasionam enormes prejuízos à cadeia
124 produtiva. Dentre essas enfermidades destaca-se uma nova doença vesicular causada pelo
125 *Senecavirus A* (SVA), que emergiu no Brasil no final de 2014 e ocasionou perdas econômicas
126 consideráveis à suinocultura nacional.

126

127 1.2 DOENÇAS VESICULARES VIRAIS

128

129 As doenças vesiculares virais são consideradas um grande problema para a saúde
animal mundial. As enfermidades vesiculares clássicas compreendem o exantema vesicular

130 suíno (*vesicular exanthema of swine* - VES), estomatite vesicular (*vesicular stomatitis* - VS),
131 doença vesicular suína (*swine vesicular disease* - SVD) e a febre aftosa (*foot-and-mouth-*
132 *disease* - FMD). A FMD é uma doença viral altamente contagiosa que gera perdas
133 econômicas consideráveis e, por isso, é considerada a enfermidade animal de maior
134 importância mundial. O vírus causal da FMD pertence ao gênero *Aphthovirus*, família
135 *Picornaviridae*. A doença está listada no Código Sanitário Animal da Organização Mundial
136 de Saúde Animal (OIE). A FMD foi a primeira enfermidade incluída na lista oficial da OIE e
137 a primeira doença para a qual países ou zonas foram classificados como livres da doença com
138 ou sem vacinação (OIE, 2009). A SVD é causada pelo enterovírus suíno, gênero *Enterovirus*,
139 que também pertence à família *Picornaviridae* (OIE, 2013). O agente etiológico da VS é
140 classificado no gênero *Vesiculovirus*, família *Rhabdoviridae*, acomete equinos, bovinos e
141 suínos. Humanos também são suscetíveis ao vírus da VS (OIE, 2015). A VES é causada por
142 um vírus classificado no gênero *Vesivirus*, da família *Caliciviridae* (HORAK, 2016). Os
143 sinais clínicos induzidos pelas diferentes doenças vesiculares são indistinguíveis e em
144 qualquer caso suspeito é obrigatória a realização de diagnóstico laboratorial para a
145 identificação da etiologia (OIE, 2009).

146 O último surto de FMD ocorrido no Brasil foi em 2006 (OIE, 2017a); desde então o
147 país é considerado zona livre da doença com vacinação, com exceção do estado de Santa
148 Catarina, que é livre sem vacinação (OIE, 2017b). Este *status* sanitário é fundamental para a
149 exportação de proteína animal e, conseqüentemente, para a economia do país, uma vez que o
150 agronegócio representa um importante setor da economia brasileira e que essa condição
151 transpõe algumas barreiras sanitárias internacionais.

152 No final do ano de 2014 e início de 2015 foram relatadas lesões vesiculares em suínos
153 que, posteriormente, comprovou-se estarem associadas à infecção por SVA. A doença clínica
154 ocorreu nas regiões brasileiras (sul, sudeste e centro-oeste) produtoras de suínos com
155 importantes impactos clínicos, epidemiológicos e produtivos para os rebanhos acometidos
156 (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015). Devido aos prejuízos causados pelo agente
157 infeccioso e aos sinais clínicos serem indistinguíveis daqueles apresentados por outras
158 doenças vesiculares virais, é de grande importância o uso de técnicas de diagnóstico rápidas e
159 sensíveis e que possam auxiliar na elucidação da infecção por SVA.

160 1.3 FAMÍLIA *PICORNAVIRIDAE*

161 O nome dessa família deriva do latim, em que *pico* significa pequeno, em referência
162 ao tamanho da partícula viral, enquanto RNA é referente ao seu genoma de ácido
163 ribonucleico. A família *Picornaviridae* é composta por vírus não envelopados com capsídeo
164 de conformação icosaédrica e tamanho aproximado de 30-32 nm. O genoma viral varia de 6,7
165 a 10,1 kb e é composto por uma fita de RNA com polaridade positiva (ZELL et al., 2017). Os
166 picornavírus estão distribuídos por todo o mundo e representam uma ameaça para a saúde
167 tanto de humanos quanto de animais (ZELL, 2017).

168 Os membros da família *Picornaviridae* possuem capacidade de infectar muitas
169 espécies de vertebrados como humanos, primatas não humanos, bovinos, suínos, equinos,
170 aves, roedores e de répteis (ZELL et al., 2017), podendo causar doenças em muitas dessas
171 espécies. Os picornavírus que acometem suínos pertencem aos gêneros *Aphthovirus*,
172 *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Sapelovirus*, *Teschovirus*, *Kobuvirus*, *Pasivirus* e *Senecavirus*
173 (ICTV, 2015).

174

175 1.4 *SENECAVIRUS A*

176 *Seneca Valley virus* 001 (SVV-001) foi isolado pela primeira vez em 2002, como
177 contaminante de cultivo celular em Gaithersburg, cidade localizada no estado de Maryland,
178 nos Estados Unidos da América (EUA) (KNOWLES; HALLENBECK, 2005). Acredita-se
179 que o vírus foi introduzido no cultivo celular de PER.C6 (células de retinoblastos fetal
180 transformadas) por meio da utilização de tripsina suína ou soro fetal bovino contendo o vírus
181 (HALES et al., 2008). SVV foi assim denominado devido ao Parque *Seneca Creek State*
182 (Maryland, EUA), localizado próximo do laboratório em que o vírus foi identificado pela
183 primeira vez (Neotropix, Inc., Malvern, PA, EUA) (SEGALES et al., 2017). Pertencente à
184 família *Picornaviridae*, o *Senecavirus A* é a única espécie do gênero *Senecavirus*, com
185 características genômicas muito semelhantes ao gênero *Cardiovirus* (ICTV, 2015).

186

187 1.4.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *SENECAVIRUS A*

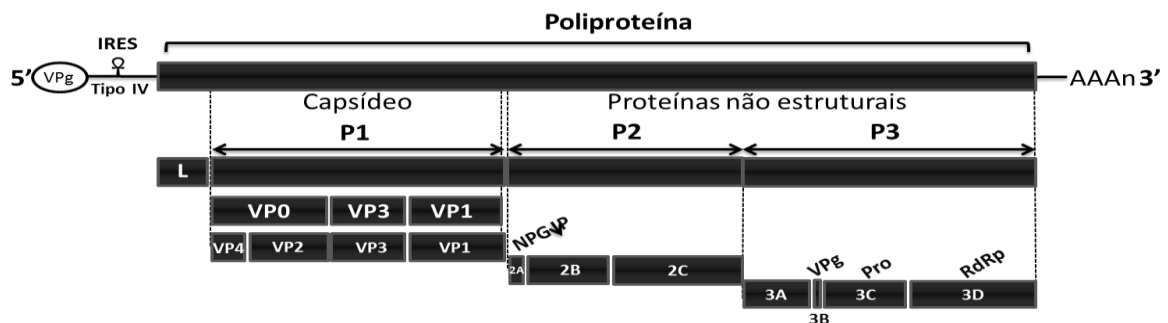
188 A cepa protótipo de senecavírus foi denominada SVV-001 e a partir dessa foi
189 estabelecido o genoma completo do vírus. O RNA genômico possui aproximadamente 7.280

190 nucleotídeos (nt), a região não traduzida 5' (*untranslated region* – UTR) contém 666 nt e 71
 191 nt na extremidade 3'UTR, seguida de uma cauda poli(A) de tamanho não definido. O genoma
 192 é constituído por uma única fase aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) de 6.543 nt,
 193 que codifica uma poliproteína de 2.181 aminoácidos (aa) que, nas suas extremidades, é
 194 flanqueada pelas duas regiões não traduzidas (5' e 3'UTR) (HALES et al., 2008). A região
 195 5'UTR do genoma do SVA possui um sítio interno de entrada no ribossomo (*internal*
 196 *ribosome entry site* - IRES), cuja função é permitir a tradução do RNA viral de forma
 197 independente de CAP (WILLCOCKS et al., 2011).

198 O genoma do vírus consiste de uma proteína *Leader* (L) e três regiões maiores,
 199 denominadas poliproteínas P1, P2 e P3. A função da proteína L ainda não foi estabelecida. A
 200 região P1 é clivada em polipeptídios estruturais VP0, VP3 e VP1, sendo que após a maturação
 201 ocorre clivagem da VP0 originando a VP2 e a VP4. Na superfície externa do capsídeo do
 202 vírus são expressas as proteínas VP1, VP2 e VP3, enquanto a VP4 está localizada na
 203 superfície interna (VENKATARAMAN et al., 2008). Apesar da função dessas proteínas na
 204 patogenia do vírus ainda não ser totalmente conhecida, a VP1 é considerada a proteína mais
 205 imunogênica nos vírus da família *Picornaviridae* (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016). Porém,
 206 acredita-se que com relação ao SVA, a VP2 seja a proteína mais imunogênica (DVORAK et
 207 al., 2017). A representação esquemática do genoma do SVA antes e após o processamento da
 208 poliproteína está demonstrada na Figura 1.

209

210 **Figura 1.** Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*.



211

212 **Fonte:** LEME; ALFIERI e ALFIERI (2017b).

213

214 As regiões P2 e P3 codificam as proteínas não estruturais do vírus, das quais três são
 215 codificadas pela P2 (2A, 2B e 2C) e quatro pela P3 (3A, 3B, 3C e 3D) (WILLCOCKS et al.,

216 2011). A proteína 2A do SVA atua no mecanismo alternativo de tradução. A proteína 2B
217 possui função semelhante aos outros picornavírus, atuando na formação de poros
218 transmembrana. O polipeptídeo 2C está envolvido na síntese de RNA (SEGALES et al.,
219 2017). Das proteínas codificadas pela região P3, a função da 3A ainda não é conhecida. O
220 polipeptídeo 3B codifica uma proteína VPg que atua como iniciadora para a síntese de RNA.
221 O polipeptídeo 3C possui função de proteinase e o 3D é uma polimerase (RNA polimerase
222 dependente de RNA), sendo esta a porção com mais sequências de aa conservados. Devido à
223 poliproteína considera-se que a estrutura genômica do SVA seja típica de outros picornavírus,
224 com o padrão L-4-3-4 (HALES et al., 2008).

225

226 1.4.2 *SENECAVIRUS A* E DOENÇA VESICULAR EM SUÍNOS

227 Em 2004, foram descritos surtos de doença vesicular em suínos de maternidade,
228 creche e terminação no estado de Indiana, EUA. Os suínos apresentavam sinais clínicos de
229 letargia, febre, claudicação e lesões vesiculares em mucosas oral e gengival, língua, focinho e
230 casco, principalmente na região da banda coronária. Os agentes virais causadores de doenças
231 vesiculares clássicas (FMD, VS, SVD e VES) não foram identificados por meio de técnicas
232 moleculares e sorológicas. Assim, a etiologia não foi estabelecida e, então, a doença foi
233 denominada Doença Vesicular Idiopática Suína (*Porcine Idiopathic Vesicular Disease –*
234 *PIVD*) (AMASS et al., 2004). Na década de 1980, outros episódios de PIVD já haviam sido
235 descritos em diferentes países/continentes como nos EUA (GIBBS et al., 1983), Austrália
236 (MUNDAY; RYAN, 1982) e Nova Zelândia (MONTGOMERY; OLIVER; POOLE, 1987).
237 Em 2007, no Reino Unido (ISID, 2007) e em 2010, na Itália (SENSI et al., 2010) também
238 foram relatados casos de doença vesicular em suínos sem etiologia conhecida.

239 Em 2007, suínos provenientes de sete granjas de Manitoba, Canadá, foram
240 transportados até Minnesota, EUA. Os animais apresentavam erosões e vesículas em pele,
241 focinho, cavidade oral e banda coronária do casco. Alguns animais apresentaram febre e a
242 maioria teve claudicação. Os testes diagnósticos foram negativos para os vírus vesiculares
243 clássicos (FMDV, SVDV, VSV e VESV). No entanto, por meio da técnica molecular da
244 reação da polimerase em cadeia, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), foi
245 detectado o RNA de SVA que passou a ser considerado o possível agente etiológico da
246 doença (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008).

247 Em 2012, também em Indiana, EUA, um caso isolado de doença vesicular suína
248 ocorreu em um suíno de seis meses de idade presente em uma exposição agropecuária. SVA
249 foi identificado em lesões vesiculares e no fluido orofaríngeo do animal. Nenhum outro
250 agente etiológico das doenças vesiculares clássicas foi detectado ocasionando as lesões
251 vesiculares. Esse foi segundo relato de doença vesicular associada à infecção pelo SVA
252 (SINGH et al., 2012).

253 No final de 2014 e início de 2015, suínos em fase de maternidade, creche, terminação
254 e reprodutores provenientes de granjas dos estados brasileiros de Minas Gerais, Goiás, Paraná,
255 Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentaram sinais clínicos de doença vesicular (LEME
256 et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015; LEME et al., 2016a; LEME et al., 2016b). A partir dos
257 resultados negativos para agentes causadores de doenças vesiculares clássicas e com base na
258 epidemiologia dos surtos, na detecção do genoma de SVA em animais acometidos e do
259 isolamento do vírus a partir de líquido vesicular, SVA foi considerado o mais provável agente
260 causal da doença vesicular suína relatada nos rebanhos das principais regiões suínícolas
261 brasileiras (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015; LAGUARDIA-NASCIMENTO et
262 al., 2016). Acredita-se que o SVA não circulava no rebanho brasileiro antes de 2014, pois não
263 foram encontradas evidências sorológicas anteriormente a esse período (SAPORITI et al.,
264 2017).

265 Nos rebanhos suínos acometidos pela primeira vez, conforme a sintomatologia clínica
266 apresentada e da idade dos animais, a taxa de morbidade variou de 4 a 70%. Em leitões
267 desmamados a morbidade variou entre 0,5 a 5%, enquanto que em animais em fase de
268 terminação e reprodutores alcançou até 30%, variando conforme a localização geográfica e
269 origem do rebanho (LEME et al., 2015; SEGALES et al., 2017). Em matrizes, foi relatada
270 uma alta taxa de morbidade, entre 70 a 90% e a mortalidade em animais da fase de
271 terminação, matrizes e reprodutores foi baixa (0,2%), com a remissão dos sinais clínicos entre
272 10 a 15 dias. Os surtos da doença vesicular pelo SVA disseminam-se rapidamente entre os
273 rebanhos. Em muitas granjas em que a doença vesicular foi relatada, altas taxas de morbidade
274 ocasionaram reflexos negativos expressivos na produtividade do rebanho (LEME; ALFIERI;
275 ALFIERI, 2017a).

276 Posteriormente à detecção de SVA em leitões lactentes, creche e terminação no Brasil, a
277 doença associada a esse vírus também foi diagnosticada especialmente em leitões de
278 maternidade e em matrizes na China (QIAN et al., 2016; WU et al., 2016b; WU et al., 2016a;

279 ZHU et al., 2017) e EUA (ZHANG et al., 2015; CANNING et al., 2016; JOSHI et al., 2016b)
280 em 2015, e Canadá (ISID, 2016), Tailândia (SAENG-CHUTO et al., 2017) e Colômbia (SUN
281 et al., 2017) em 2016. Portanto, devido à sua intensidade e abrangência geográfica, a infecção
282 pelo SVA demonstrou-se muito importante para a suinocultura, devido ao grande risco
283 sanitário representado por seu agente etiológico.

284

285 **1.4.2.1 Doença multissistêmica em leitões recém-nascidos**

286 Concomitante com a sintomatologia vesicular em suínos adultos e em fase de
287 terminação, também foram relatados aumentos nas taxas de mortalidade em leitões recém-
288 nascidos, entre um a quatro dias de idade. A sintomatologia multissistêmica é caracterizada
289 por letargia, hiperemia cutânea, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita (LEME et al.,
290 2015; VANNUCCI et al., 2015). Os distintos sinais clínicos observados nas diferentes idades
291 podem ser decorrentes da idade dos suínos infectados e / ou a capacidade de resposta
292 imunológica produzida pelos animais. Provavelmente os leitões recém-nascidos são mais
293 susceptíveis a infecção pelo SVA e com isso desenvolvem uma manifestação clínica
294 multissistêmica (DALL AGNOL et al., 2018).

295 Leitões com morte espontânea foram submetidos à investigação diagnóstica e
296 apresentaram resultados positivos para o SVA em diferentes órgãos/tecidos, tanto pela técnica
297 de RT-PCR convencional quanto por imuno-histoquímica (LEME et al., 2016a; LEME et al.,
298 2016b). Em leitões recém-nascidos naturalmente infectados pelo SVA, o RNA viral foi
299 quantificado nos diferentes órgãos, sendo que os tecidos linfoides (baço e tonsila)
300 apresentaram maior carga viral, seguidos de pulmões e fígado. Foram encontradas as altas
301 cargas virais nos órgãos linfoides (9,06 a 10,38 log₁₀/cópias por grama de tecido) desses
302 leitões, sugerindo que o vírus tem tropismo por esses tecidos (DALL AGNOL et al., 2018).

303 Em leitões recém-nascidos as taxas de morbidade e de mortalidade são consideradas
304 altas, principalmente entre um e quatro dias de idade, com taxas chegando a 70% de
305 morbidade e a 15-30% de mortalidade. A sintomatologia e mortalidade perduram por duas a
306 três semanas no rebanho acometido (LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2017a). No entanto, os
307 leitões continuam eliminando SVA por até nove semanas, fato que demonstra o risco de
308 disseminação da doença após o desmame, especialmente no período que compreende a
309 entrada na creche (TOUSIGNANT et al., 2017).

310 1.4.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

311 Para compreender mais sobre a dinâmica de infecção e patogenia causada pelo SVA,
312 estudos experimentais foram conduzidos em suínos de nove semanas (MONTIEL et al., 2016)
313 e quatro meses de idade (JOSHI et al., 2016a). Esses estudos demonstraram que SVA pode
314 ser o agente etiológico de doença vesicular em suínos. Foi observado que os sinais clínicos
315 iniciaram-se entre 4-5 dias pós-infecção (dpi) e perdurou por aproximadamente 10-12 dias
316 (MONTIEL et al., 2016). O vírus teve curto período de incubação e induziu doença vesicular
317 autolimitante aguda nos animais experimentalmente infectados. A viremia ocasionada pelo
318 SVA coincidiu com a fase clínica da doença, entre 3 a 10 dpi. Nessa fase ocorreu um pico de
319 cópias genômicas das partículas virais circulantes e, a partir de 4 dpi, começaram a surgir as
320 lesões vesiculares. No quinto dia os animais soroconverteram e começou o declínio da
321 viremia (JOSHI et al., 2016a).

322 Os sinais clínicos ocasionados pelo SVA são clinicamente indistinguíveis daqueles
323 observados na FMD e nas outras doenças vesiculares clássicas. Os primeiros sinais clínicos
324 ocorreram no 4º dpi e foram caracterizados por claudicação, letargia e vesículas localizadas
325 em focinhos e/ou cascos, perdurando por até 10 dpi (JOSHI et al., 2016a; MONTIEL et al.,
326 2016). Inicialmente ocorre eritema da pele, progredindo para o desenvolvimento de vesículas.
327 Após a ruptura das vesículas ocorre erosão da pele, a qual evolui para a formação de crostas
328 na área acometida (5-6 dpi). As lesões se resolvem completamente entre 12-16 dpi. Nem
329 todos os animais apresentam formação de vesículas (JOSHI et al., 2016a). A gravidade das
330 lesões nas bandas coronárias variaram de palidez até lesões vesiculares com ulcerações,
331 erosões, com formação de crostas, e necrose focal no espaço interdigital (MONTIEL et al.,
332 2016).

333 Os achados histopatológicos nos órgãos linfoides, tonsilas, baço e linfonodos de
334 animais de quatro meses de idade experimentalmente inoculados demonstraram moderada
335 hiperplasia linfoide, sugerindo que provavelmente esses tecidos representem sítios de
336 replicação do SVA. Atelectasia e congestão difusa foram observadas nos pulmões. Durante a
337 fase aguda da infecção, partículas infectantes do vírus se distribuem amplamente, sendo
338 detectadas em diversos órgãos como pulmões, linfonodos, fígado, baço, tonsilas e intestino
339 delgado e grosso (JOSHI et al., 2016a).

340 Em leitões naturalmente infectados, com idade entre um a dez dias, foram encontradas
341 alterações histopatológicas como, degeneração balonosa do epitélio de transição da bexiga e

342 da pelve renal. No intestino delgado os achados histopatológicos revelam atrofia das
343 vilosidades (enterite atrófica) e fusão das vilosidades. Nos pulmões foi observada pneumonia
344 intersticial e no sistema nervoso central, meningoencefalite não-supurativa, necrose neuronal,
345 edema cerebral e plexo-coroidite. Em órgãos linfoides, foi observada hiperplasia linfoide
346 folicular tanto em linfonodos mesentéricos quanto em tonsilas. Degeneração balonosa do
347 epitélio de transição foi a lesão mais frequentemente encontrada e associada ao SVA, sendo
348 que o vírus foi detectado nas lesões através da IHC (OLIVEIRA et al., 2017).

349

350 **1.4.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA E ELIMINAÇÃO VIRAL**

351 Em estudos experimentais, a detecção de anticorpos neutralizantes para o SVA
352 começa a ocorrer a partir do 5º dpi. Esses altos títulos de anticorpos específicos contra SVA
353 no soro influenciam na redução da viremia, da gravidade da doença, da excreção do vírus e da
354 carga viral detectável nos tecidos (JOSHI et al., 2016a). Em uma infecção natural, relatada
355 nos EUA, por meio de um teste de ELISA indireto foram detectados anticorpos para a VP2 de
356 SVA em 84% dos animais amostrados após o aparecimento dos sinais clínicos. Os animais
357 permaneceram com títulos de anticorpos por pelo menos 60 dias (última coleta) após a
358 observação dos sinais clínicos, embora iniciassem a regressão, a partir do título máximo
359 observado no 11º dpi (DVORAK et al., 2017). No Brasil, também em infecções naturais, por
360 meio da técnica de vírus neutralização (VN) foram encontrados títulos de anticorpos anti-
361 SVA ≥ 4.096 em animais clinicamente infectados (SAPORITI et al., 2017).

362 Em condições experimentais a eliminação viral em secreções orais e nasais ocorreu até
363 28 dpi, em swabs de fezes o vírus foi eliminado até 14 dpi. O pico de excreção com altas
364 cargas virais perdurou do primeiro até 5º dpi (JOSHI et al., 2016a). Em um surto em leitões
365 na fase de maternidade foi detectada excreção do SVA até nove semanas após a infecção
366 (TOUSIGNANT et al., 2017). Tanto na infecção natural quanto na experimental, o SVA é
367 eliminado nas secreções oral e nasal, sêmen, fezes, além dos fluidos vesiculares, que contém
368 grandes quantidades de vírus. A excreção viral contribui para a disseminação do vírus entre
369 animais e, indiretamente, para a contaminação ambiental (JOSHI et al., 2016a; LEME;
370 ALFIERI; ALFIERI, 2017a; STUROS et al., 2017; TOUSIGNANT et al., 2017).

371 1.4.5 DIAGNÓSTICO

372 Muitos testes diagnósticos são utilizados tanto para a identificação de infecções
373 ocasionadas pelo SVA quanto para realizar a associação de lesões vesiculares e sinais clínicos
374 com o processo infeccioso, destacando-se entre eles as técnicas moleculares. Diferentes
375 métodos moleculares foram estabelecidos para o diagnóstico e a caracterização molecular das
376 cepas de SVA incluindo RT-PCR convencional (LEME et al., 2015; JOSHI et al., 2016b;
377 LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016; WANG et al., 2016), nested-RT-PCR
378 (FERONATO et al., 2017), RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), tanto com *SYBR Green* quanto
379 com *TaqMan* (BRACHT et al., 2016; CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al.,
380 2016; GUO et al., 2016; HAUSE et al., 2016; JOSHI et al., 2016b; LAGUARDIA-
381 NASCIMENTO et al., 2016; DALL AGNOL et al., 2017; FOWLER et al., 2017),
382 hibridização *in situ* (JOSHI et al., 2016a; RESENDE; MARTHALER; VANNUCCI, 2017),
383 assim como as plataformas de sequenciamento genômico de nova geração (NGS)
384 (VANNUCCI et al., 2015; MONTIEL et al., 2016; SUN et al., 2017).

385 A imuno-histoquímica (IHC) é uma técnica muito utilizada, pois por meio do uso de
386 anticorpos policlonais e/ou monoclonais possibilita identificar antígenos virais diretamente
387 em amostras de tecidos/órgãos demonstrando a presença da partícula viral naquele
388 determinado material biológico. Adicionalmente, a histopatologia fornece detalhes que,
389 juntamente com a IHC, auxiliam consideravelmente no diagnóstico do SVA (YANG; VAN
390 BRUGGEN; XU, 2012; JOSHI et al., 2016a; LEME et al., 2016a; LEME et al., 2016b;
391 OLIVEIRA et al., 2017). A microscopia eletrônica de transmissão possibilita associar a
392 presença de partículas virais e observação de danos celulares causados pelo vírus,
393 contribuindo para o diagnóstico de SVA (OLIVEIRA et al., 2017).

394 O diagnóstico de SVA por meio de técnicas sorológicas também foi descrito incluindo
395 sistemas de ELISA indireto (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012; GIMENEZ-LIROLA et
396 al., 2016; DVORAK et al., 2017), ELISA competitivo (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012)
397 e imunofluorescência indireta (IFI) (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012; GUO et al., 2016;
398 JOSHI et al., 2016a; MONTIEL et al., 2016). As técnicas de IFI e ELISA indireto e
399 competitivo foram desenvolvidas utilizando anticorpos monoclonais específicos para o SVA
400 ou com a proteína VP1 recombinante do vírus. O teste de VN é outra técnica que pode ser
401 empregada para o diagnóstico sorológico da infecção pelo SVA (YANG; VAN BRUGGEN;
402 XU, 2012; GOOLIA et al., 2017; SAPORITI et al., 2017).

403 1.4.5.1 Diagnóstico quantitativo em virologia

404 A utilização da PCR quantitativa (qPCR) na rotina diagnóstica de agentes infecciosos
405 vem aumentando anualmente, devido à série de vantagens quando comparados com os ensaios
406 de PCR convencional (OIE, 2008). A execução da qPCR é menos laboriosa, exigindo menos
407 mão de obra, pois as etapas são concentradas, havendo redução no tempo de sua realização. A
408 facilidade de desempenho e maior velocidade para obtenção de resultados são outras
409 vantagens da utilização, pois os produtos amplificados são detectados durante os ciclos de
410 amplificação não necessitando de uma etapa posterior para visualização dos *amplicons* (ESPY
411 et al., 2006). O ensaio é considerado um sistema fechado e homogêneo, o que diminui o risco
412 de contaminação por manipulação, principalmente dos produtos pós-amplificação. A técnica
413 apresenta excelente sensibilidade e especificidade. Dessa forma, o método quantitativo torna-
414 se uma ferramenta atraente quando comparado com os métodos de PCR convencionais e até
415 mesmo, com as técnicas biológicas clássicas, como isolamento viral em cultivo celular
416 (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

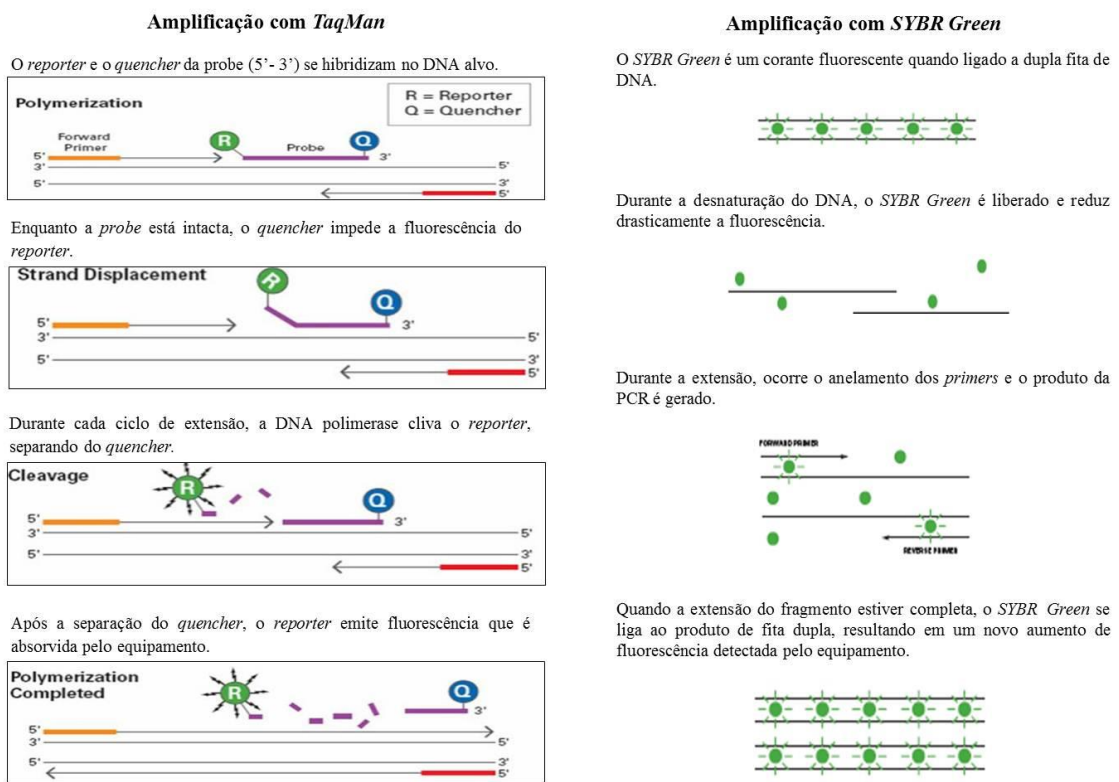
417 Vários sistemas de detecção de ácido nucleico por qPCR estão disponíveis. Os mais
418 utilizados para a detecção e quantificação de agentes infecciosos são *SYBR Green* e *TaqMan*
419 (Figura 2). O *SYBR Green* é um método capaz de detectar a acumulação de qualquer produto
420 de DNA de dupla fita. É um sistema sensível, mas com menor especificidade quando ao
421 sistema *TaqMan*. Diferentemente, o sistema *TaqMan* utiliza *probes* de hidrólise para detectar
422 ácidos nucleicos. As sondas são pequenos fragmentos de oligonucleotídeos que na porção 5'
423 possui um *reporter* (fluoróforo) e na 3' um *quencher*. Durante a amplificação, a *probe* se
424 hibridiza ao produto de PCR alvo e o *quencher* impede a emissão de fluorescência pelo
425 *reporter*. Na etapa seguinte, durante a extensão da fita molde, a *Taq* polimerase cliva a região
426 5' da *probe*, separando o fluoróforo do *quencher*, levando à emissão de fluorescência, que é
427 então absorvida pelo equipamento. O uso de *probes* de hidrólise torna o sistema mais
428 específico quando comparado ao *SYBR Green* (ESPY et al., 2006).

429 A qPCR e/ou qRT-PCR tem sido amplamente utilizada para estudos dos agentes
430 causadores de doenças infecciosas. Com a estimativa da carga viral é possível determinar o
431 curso das enfermidades virais e inferindo se a doença está na fase aguda ou crônica. A
432 mensuração da carga viral em animais infectados possibilita compreender a interação vírus-
433 hospedeiro e, com isso, identificar progressão da enfermidade ou até mesmo a reativação da
434 replicação viral. A gravidade de algumas doenças pode ser relacionada com as cargas virais,

435 enquanto com a utilização da PCR convencional não é possível fazer essa associação
 436 simplesmente com detecção da presença ou ausência do patógeno. A metodologia quantitativa
 437 também tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica em doenças emergentes,
 438 proporcionando a vinculação entre o vírus identificado e os sinais clínicos observados
 439 (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

440

441 **Figura 2:** Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos com os sistemas *TaqMan* e *SYBR*
 442 *Green*.



443

444 **Fonte:** Bio-Resource (2013). Adaptado. Disponível em: <<http://technologyinscience.blogspot.com.br/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.WkJ2qtKnHIW>>.

445 Acessado em: 26 Dez. 2017.

446

447 1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

448 Desde 2014, SVA tem-se apresentado como um agente infeccioso emergente na
 449 suinocultura mundial e pouco ainda se conhece sobre as suas propriedades biológicas e
 450 epidemiologia. Decorrente das diferenças observadas nas manifestações clínicas da infecção
 451

452 em animais recém-nascidos, jovens e adultos é imprescindível a realização de estudos, tanto
453 em condições naturais quanto experimentais, na tentativa da elucidação de aspectos
454 importantes relativos à forma de manifestação clínica, à fisiopatogenia da infecção e ao
455 tropismo viral nos diferentes órgãos/tecidos. Para isso, é necessário o desenvolvimento de
456 técnicas de diagnóstico que possam fornecer dados e informações mais específicas sobre o
457 processo infeccioso incluindo algumas propriedades biológicas do SVA, aspectos relativos às
458 interações vírus-hospedeiro, distribuição da carga viral em diferentes órgãos, diferenciação de
459 infecção ativa ou persistente, estabelecimento da dinâmica de infecção e progresso da doença
460 clínica. A análise do conjunto dessas informações permitirá, por meio do melhor
461 conhecimento de características inerentes ao vírus, ao hospedeiro e ao processo infeccioso,
462 disponibilizar medidas de mitigação de risco que incluam condutas de biossegurança internas
463 e externas e métodos de diagnóstico de alta rapidez, sensibilidade, especificidade e
464 repetibilidade. O estabelecimento e consolidação dessas ações abrem a perspectiva do
465 desenvolvimento de imunógenos para uso no controle e profilaxia das infecções por SVA e/ou
466 para controle de surtos. Com isso, a pesquisa e o desenvolvimento estarão contribuindo com a
467 conquista e manutenção da saúde na cadeia suinícola brasileira.

468

469 REFERÊNCIAS

470

471 ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção brasileira de carne suína.**
 472 2017. Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-interno/porco/producao-brasileira-de-carne-suina-ton)
 473 [interno/porco/producao-brasileira-de-carne-suina-ton](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-interno/porco/producao-brasileira-de-carne-suina-ton)>. Acesso em: 22 Dez. 2017.

474 AMASS, S.F.; SCHNEIDER, J.L.; MILLER, C.A.; SHAWKY, S.A.; STEVENSON,
 475 G.W.; WOODRUFF, M.E. Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. **Journal of**
 476 **Swine Health and Production**, v. 12, p. 192-196, 2004.

477 BRACHT, A.J.; O'HEARN, E.S.; FABIAN, A.W.; BARRETTE, R.W.; SAYED, A. Real-
 478 Time reverse transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular
 479 diagnostic specimens. **PLoS One**, v. 11, n. 1, 2016.

480 CANNING, P.; CANON, A.; BATES, J.L.; GERARDY, K.; LINHARES, D.C.;
 481 PINEYRO, P.E.; SCHWARTZ, K.J.; YOON, K.J.; RADEMACHER, C.J.; HOLTKAMP,
 482 D.; KARRIKER, L. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with
 483 Senecavirus A in a U.S. sow farm. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 4, p.
 484 373-378, 2016.

485 DALL AGNOL, A.M.; OTONEL, R.A.; LEME, R.A.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. A
 486 TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal
 487 piglets. **Mol Cell Probes**, v. 33, p. 28-31, 2017.

488 DALL AGNOL, A.M.; MIYABE, F.M.; LEME, R.A.; OLIVEIRA, T.E.S.; HEADLEY,
 489 S.A.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Quantitative analysis of senecavirus A in tissue
 490 samples from naturally infected newborn piglets. **Archives of Virology**, v. 163, n. 2, p. 527-
 491 531, 2018.

492 DVORAK, C.M.; AKKUTAY-YOLDAR, Z.; STONE, S.R.; TOUSIGNANT, S.J.;
 493 VANNUCCI, F.A.; MURTAUGH, M.P. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for
 494 the identification of antibodies to Senecavirus A in swine. **BMC Veterinary Research**, v. 13,
 495 n. 1, p. 50, 2017.

496 ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER,
 497 E.A.; YAO, J.D.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R., 3RD;
 498 SMITH, T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory
 499 testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

500 FERONATO, C.; LEME, R.A.; DINIZ, J.A.; AGNOL, A.M.D.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI,
 501 A.A. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis.
 502 **Tropical Animal Health and Production**, 10.1007/s11250-017-1436-z. 2017.

503 FOWLER, V.L.; RANSBURGH, R.H.; POULSEN, E.G.; WADSWORTH, J.; KING, D.P.;
 504 MIOULET, V.; KNOWLES, N.J.; WILLIAMSON, S.; LIU, X.; ANDERSON, G.A.;
 505 FANG, Y.; BAI, J. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley
 506 virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs. **Journal of Virological**
 507 **Methods**, v. 239, p. 34-37, 2017.

- 508 GIBBS, E.P.J.; STODDARD, H.L.; YEDLOUTCHNIG, R.J.; HOUSE, J.A.; LEGGE, M. A
509 vesicular disease of pigs in Florida of unknown etiology. **Florida Veterinary Journal**, v. 12,
510 p. 25-27, 1983.
- 511 GIMENEZ-LIROLA, L.G.; RADEMACHER, C.; LINHARES, D.; HARMON, K.;
512 ROTOLO, M.; SUN, Y.; BAUM, D.H.; ZIMMERMAN, J.; PINEYRO, P. Serological and
513 molecular detection of Senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic
514 vesicular disease and neonatal mortality. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 8, p.
515 2082-2089, 2016.
- 516 GOOLIA, M.; VANNUCCI, F.; YANG, M.; PATNAYAK, D.; BABIUK, S.; NFON, C.K.
517 Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and
518 confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera. **The Journal of Veterinary**
519 **Diagnostic Investigation**, v. 29, p. 250-253, 2017.
- 520 GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.; MAIA, G.; LEMOS, M.; ITO, M.; CUSTODIO, S.
521 Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o
522 apoio do BNDES. **BNDS**, v. 45, p. 85-136, 2017.
- 523 GUO, B.; PINEYRO, P.E.; RADEMACHER, C.J.; ZHENG, Y.; LI, G.; YUAN, J.;
524 HOANG, H.; GAUGER, P.C.; MADSON, D.M.; SCHWARTZ, K.J.; CANNING, P.E.;
525 ARRUDA, B.L.; COOPER, V.L.; BAUM, D.H.; LINHARES, D.C.; MAIN, R.G.; YOON,
526 K.J. Novel Senecavirus A in swine with vesicular disease, United States, July 2015.
527 **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1325-1327, 2016.
- 528 HALES, L.M.; KNOWLES, N.J.; REDDY, P.S.; XU, L.; HAY, C.; HALLENBECK, P.L.
529 Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic
530 picornavirus. **The Journal of General Virology**, v. 89, n. Pt 5, p. 1265-1275, 2008.
- 531 HAUSE, B.M.; MYERS, O.; DUFF, J.; HESSE, R.A. Senecavirus A in pigs, United States,
532 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1323-1325, 2016.
- 533 HORAK, S., KILLORAN, K., LEEDOM LARSON, KR. **Vesicular exanthema of swine**
534 **virus**. 2016. Disponível em: <[http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-vesicular-](http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-vesicular-exanthema-swine-virus)
535 [exanthema-swine-virus](http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-vesicular-exanthema-swine-virus)>. Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 536 ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus taxonomy: 2015 release**.
537 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 10 Jan.
538 2017.
- 539 ISID. International Society for Infectious Diseases. **Vesicular disease, porcine UK (N.**
540 **Ireland): not FMD, SVD**. ProMED-mail. Archive Number: 20070110.0099. 2007.
541 Disponível em: <<http://www.promedmail.org/direct.php?id=6471>>. Acesso em: 08 Fev. 2015.
- 542 ISID. International Society for Infectious Diseases. **Senecavirus A Canada: (Ontario)**
543 **swine, 2016**. ProMED-mail. Archive Number: 20161009.4546471. 2016. Disponível em:
544 <<http://www.promedmail.org/direct.php?id=20161009.4546471>>. Acesso em: 28 Dez. 2016.
- 545 JOSHI, L.R.; FERNANDES, M.H.; CLEMENT, T.; LAWSON, S.; PILLATZKI, A.;
546 RESENDE, T.P.; VANNUCCI, F.A.; KUTISH, G.F.; NELSON, E.A.; DIEL, D.G.
547 Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **The Journal of General Virology**,
548 v. 97, n. 12, p. 3267-3279, 2016a.

- 549 JOSHI, L.R.; MOHR, K.A.; CLEMENT, T.; HAIN, K.S.; MYERS, B.; YAROS, J.;
550 NELSON, E.A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; GAVA, D.; SCHAEFER, R.; CARON,
551 L.; DEE, S.; DIEL, D.G. Detection of the emerging picornavirus Senecavirus A in pigs, mice,
552 and houseflies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1536-1545, 2016b.
- 553 KNOWLES, N. J., HALLENBECK, P. L. 2005. A new picornavirus is most closely related to
554 cardioviruses. EUROPIC 2005: **XIIIth Meeting of the European Study Group on the**
555 **Molecular Biology of Picornaviruses**. European Study Group on the Molecular Biology of
556 Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, p. A14.
- 557 LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; GASPARINI, M.R.; SALES, E.B.; RIVETTI, A.V.,
558 JR.; SOUSA, N.M.; OLIVEIRA, A.M.; CAMARGOS, M.F.; PINHEIRO DE OLIVEIRA,
559 T.F.; GONCALVES, J.P.; MADUREIRA, M.C.; RIBEIRO, D.P.; MARCONDES, I.V.;
560 BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; FONSECA, A.A., JR. Molecular epidemiology of
561 Senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. **The Veterinary Journal**, v.
562 216, p. 207-209, 2016.
- 563 LEME, R.A.; ZOTTI, E.; ALCANTARA, B.K.; OLIVEIRA, M.V.; FREITAS, L.A.;
564 ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian
565 pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 6, p. 603-11, 2015.
- 566 LEME, R.A.; OLIVEIRA, T.E.; ALFIERI, A.F.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A.
567 Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-
568 induced lesions in neonatal piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 2-3, p.
569 145-55, 2016a.
- 570 LEME, R.A.; OLIVEIRA, T.E.S.; ALCÂNTARA, B.K.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI,
571 A.F.; YANG, M.; ALFIERI, A.A. Clinical manifestations of Senecavirus A infection in
572 neonatal pigs, Brazil, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1238-1241, 2016b.
- 573 LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Update on Senecavirus Infection in Pigs.
574 **Viruses**, v. 9, n. 7, 2017a.
- 575 LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.. Doenças víricas emergentes - seção
576 Senecavirus A. In: Eduardo Furtado Flores. (Org.). **Virologia Veterinária**. 3ªed. Santa Maria:
577 Universidade Federal de Santa Maria, 2017, v. 1, p. 1079-1090b.
- 578 MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids**
579 **Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.
- 580 MONTGOMERY, J.F.; OLIVER, R.E.; POOLE, W.S. A vesiculo-bullous disease in pigs
581 resembling foot and mouth disease. I. Field cases. **The New Zealand Veterinary Journal**, v.
582 35, n. 3, p. 21-26, 1987.
- 583 MONTIEL, N.; BUCKLEY, A.; GUO, B.; KULSHRESHTHA, V.; VANGEELLEN, A.;
584 HOANG, H.; RADEMACHER, C.; YOON, K.J.; LAGER, K. Vesicular disease in 9-week-
585 old pigs experimentally infected with Senecavirus A. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n.
586 7, p. 1246-1248, 2016.
- 587 MUNDAY, B.L.; RYAN, F.B. Vesicular lesions in swine - possible association with the
588 feeding of marine products. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, n. 6, p. 193, 1982.

- 589 OIE. World Organisation for Animal Health. 2008. **Chapter 1.1.5. Validation and quality**
 590 **control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious**
 591 **diseases.** Disponível em: <[http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-](http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)
 592 [manual/access-online/](http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)>. Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 593 OIE. World Organisation for Animal Health. **Chapter 2.1.5. Foot and Mouth Disease**
 594 **2009.** Disponível em: <http://www.oie.int/eng/A_FMD2012/docs/2.01.05_FMD.pdf>. Acesso
 595 em: 22 Dez. 2017.
- 596 OIE. World Organisation for Animal Health. **Swine Vesicular Disease.** 2013. Disponível
 597 em:<[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_VESICULAR_DISEASE.pdf)
 598 [cards/SWINE_VESICULAR_DISEASE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_VESICULAR_DISEASE.pdf)>. Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 599 OIE. World Organisation for Animal Health. **Chapter 2.1.23 Vesicular Stomatitis.** 2015.
 600 Disponível em:
 601 <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR STO](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf)
 602 [MATITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf)>. Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 603 OIE. World Organisation for Animal Health. **Animal Health Situation 2017a.** Disponível
 604 em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/animalsituation>.
 605 Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 606 OIE. Foot and Mouth Disease (FMD). 2017b. Disponível em:
 607 <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/fmd/en-fmd-carte/>>.
 608 Acesso em: 22 Dez. 2017.
- 609 OLIVEIRA, T.E.S.; MICHELAZZO, M.M.Z.; FERNANDES, T.; DE OLIVEIRA, A.G.;
 610 LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; HEADLEY, S.A. Histopathological,
 611 immunohistochemical, and ultrastructural evidence of spontaneous Senecavirus A-induced
 612 lesions at the choroid plexus of newborn piglets. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- 613 PASMA, T.; DAVIDSON, S.; SHAW, S.L. Idiopathic vesicular disease in swine in
 614 Manitoba. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 1, p. 84-85, 2008.
- 615 QIAN, S.; FAN, W.; QIAN, P.; CHEN, H.; LI, X. Isolation and full-genome sequencing of
 616 Seneca Valley virus in piglets from China, 2016. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 173, 2016.
- 617 RESENDE, T.P.; MARTHALER, D.G.; VANNUCCI, F.A. A novel RNA-based in situ
 618 hybridization to detect Seneca Valley virus in neonatal piglets and sows affected with
 619 vesicular disease. **PLoS One**, v. 12, n. 4, 2017.
- 620 SAENG-CHUTO, K.; RODTIAN, P.; TEMEEYASEN, G.; WEGNER, M.; NILUBOL, D.
 621 The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016. **Transboundary and**
 622 **Emerging Diseases**, 10.1111/tbed.12654. 2017.
- 623 SAPORITI, V.; FRITZEN, J.T.T.; FERONATO, C.; LEME, R.A.; LOBATO, Z.I.P.;
 624 ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for
 625 Seneca Valley virus infection in major pig producing states of Brazil. **Veterinary Research**
 626 **Communications**, v. 41, n. 4, p. 317-321, 2017.
- 627 SEGALLES, J.; BARCELLOS, D.; ALFIERI, A.; BURROUGH, E.; MARTHALER, D.
 628 Senecavirus A. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 11-21, 2017.

- 629 SENSI, M., CATALANO, A., TINARO, M., MARIOTTI, C., PANZIERI, C., MARCHI, S.,
630 COSTARELLI, S. 2010. Idiopathic vesicular disease (IVD): a case report in the centre of
631 Italy. **21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress**; July 18-21; Vancouver,
632 Canada: International Pig Veterinary Society; p. 46.
- 633 SINGH, K.; CORNER, S.; CLARK, S.G.; SCHERBA, G.; FREDRICKSON, R. Seneca
634 Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **Journal of**
635 **Veterinary Science & Technology**, v. 3, n. 6, p. 1-3, 2012.
- 636 STUROS, M.; MURRAY, D.; REICKS, D.; CANO, J.P.; ROSSOW, S.; VANNUCCI, F.
637 Natural and experimentally-induced Senecavirus A infections in boars. 2017. Disponível em:
638 <[https://www.vetmed.umn.edu/sites/vetmed.umn.edu/files/shmp_2017118.18_svv_in_boars_-](https://www.vetmed.umn.edu/sites/vetmed.umn.edu/files/shmp_2017118.18_svv_in_boars_-_science_page.pdf)
639 [science_page.pdf](https://www.vetmed.umn.edu/sites/vetmed.umn.edu/files/shmp_2017118.18_svv_in_boars_-_science_page.pdf)>. Acesso em: 22 December 2017.
- 640 SUN, D.; VANNUCCI, F.; KNUTSON, T.P.; CORZO, C.; MARTHALER, D.G.
641 Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia. **Transboundary and**
642 **Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 1346-1349, 2017.
- 643 TOUSIGNANT, S.J.P.; BRUNER, L.; SCHWARTZ, J.; VANNUCCI, F.; ROSSOW, S.;
644 MARTHALER, D.G. Longitudinal study of Senecavirus a shedding in sows and piglets on a
645 single United States farm during an outbreak of vesicular disease. **BMC Veterinary**
646 **Research**, v. 13, n. 1, p. 277, 2017.
- 647 VANNUCCI, F.A.; LINHARES, D.C.; BARCELLOS, D.E.; LAM, H.C.; COLLINS, J.;
648 MARTHALER, D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular
649 fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. **Transboundary and**
650 **Emerging Diseases**, v. 62, n. 6, p. 589-593, 2015.
- 651 VENKATARAMAN, S.; REDDY, S.P.; LOO, J.; IDAMAKANTI, N.; HALLENBECK,
652 P.L.; REDDY, V.S. Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus
653 representing a new genus. **Structure**, v. 16, n. 10, p. 1555-1561, 2008.
- 654 WANG, L.; PRARAT, M.; HAYES, J.; ZHANG, Y. Detection and Genomic
655 Characterization of Senecavirus A, Ohio, USA, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22,
656 n. 7, p. 1321-1323, 2016.
- 657 WILLCOCKS, M.M.; LOCKER, N.; GOMWALK, Z.; ROYALL, E.; BAKHSHESH, M.;
658 BELSHAM, G.J.; IDAMAKANTI, N.; BURROUGHS, K.D.; REDDY, P.S.;
659 HALLENBECK, P.L.; ROBERTS, L.O. Structural features of the Seneca Valley virus
660 internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES.
661 **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, p. 4452-4461, 2011.
- 662 WU, Q.; ZHAO, X.; CHEN, Y.; HE, X.; ZHANG, G.; MA, J. Complete genome sequence
663 of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1,
664 2016a.
- 665 WU, Q.; ZHAO, X.; BAI, Y.; SUN, B.; XIE, Q.; MA, J. The first identification and
666 complete genome of Senecavirus A affecting pig with Idiopathic Vesicular Disease in China.
667 **Transboundary and Emerging Diseases**, 10.1111/tbed.12557. 2016b.
- 668 YANG, M.; VAN BRUGGEN, R.; XU, W. Generation and diagnostic application of
669 monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. **The Journal of Veterinary Diagnostic**

- 670 **Investigation**, v. 24, n. 1, p. 42-50, 2012.
- 671 ZELL, R.; DELWART, E.; GORBALENYA, A.E.; HOVI, T.; KING, A.M.Q.;
672 KNOWLES, N.J.; LINDBERG, A.M.; PALLANSCH, M.A.; PALMENBERG, A.C.;
673 REUTER, G.; SIMMONDS, P.; SKERN, T.; STANWAY, G.; YAMASHITA, T.; ICTV
674 REPORT, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. **The Journal of General**
675 **Virology**, v. 98, n. 10, p. 2421-2422, 2017.
- 676 ZELL, R. Picornaviridae-the ever-growing virus family. **Archives of Virology**,
677 10.1007/s00705-017-3614-8. 2017.
- 678 ZHANG, J.; PINEYRO, P.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; LI, G.; RADEMACHER, C.;
679 DERSCHEID, R.; GUO, B.; YOON, K.J.; MADSON, D.; GAUGER, P.; SCHWARTZ,
680 K.; HARMON, K.; LINHARES, D.; MAIN, R. Full-length genome sequences of
681 Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U.S. swine. **Genome**
682 **Announcements**, v. 3, n. 6, 2015.
- 683 ZHU, Z.; YANG, F.; CHEN, P.; LIU, H.; CAO, W.; ZHANG, K.; LIU, X.; ZHENG, H.
684 Emergence of novel Seneca Valley virus strains in China, 2017. **Transboundary and**
685 **Emerging Diseases**, v. 64, n. 4, p. 1024-1029, 2017.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

687

688

2.1 OBJETIVO GERAL

- 690 • Avaliar a distribuição tecidual e a carga viral de SVA em diferentes amostras de
691 órgãos/tecidos de leitões recém-nascidos, naturalmente infectados, sintomáticos e
692 provenientes de rebanhos suínos com histórico de doença vesicular em animais adultos.

693

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

695

- 696 • Estabelecer um teste de qRT-PCR utilizando *TaqMan*, com *primers* e *probe* específicos,
697 como ferramenta diagnóstica para detecção e quantificação de RNA de SVA em
698 diferentes amostras biológicas de suínos.
- 699 • Padronizar a técnica de qRT-PCR a partir de clones de produtos específicos
700 amplificados.
- 701 • Determinar a distribuição de RNA de SVA em diferentes órgãos/tecidos de leitões
702 acometidos por infecção sistêmica.
- 703 • Determinar e comparar a carga viral de SVA em diferentes órgãos/tecidos de leitões
704 recém-nascidos naturalmente infectados.
- 705 • Associar a distribuição tecidual e a carga viral de SVA com lesões histopatológicas e
706 com a detecção de antígenos SVA específicos por meio da técnica de imuno-
707 histoquímica.

3 ARTIGOS PUBLICADOS

3 ARTIGOS PUBLICADOS

3.1 CAPÍTULO 1
A TAQMAN-BASED qRT-PCR ASSAY FOR *SENECAVIRUS* A DETECTION
IN TISSUE SAMPLES OF NEONATAL PIGLETS
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2017.03.002>)



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

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

Short communication

A TaqMan-based qRT-PCR assay for *Senecavirus A* detection in tissue samples of neonatal piglets



Alais Maria Dall Agnol^{a, b}, Rodrigo Alejandro Arellano Otonel^a, Raquel Arruda Leme^{a, b}, Amauri Alcindo Alfieri^{a, b, *}, Alice Fernandes Alfieri^{a, b}

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

^b Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário, PO Box 10011, Londrina, PR CEP 86057-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2016
Received in revised form
20 January 2017
Accepted 2 March 2017
Available online 4 March 2017

Keywords:

Picornavirus infection
Quantitative PCR
Real-time RT-PCR
Seneca valley virus
Swine
Vesicular disease

ABSTRACT

This study describes a sensitive (1.3×10^1 genomic copies/ μL) and specific TaqMan-based qRT-PCR assay able to detect and quantify SVA RNA in porcine biological samples. The technique represents an efficient tool for the virus diagnosis and assessment of SVA load in tissues of infected animals and for epidemiological studies.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Senecavirus A (SVA) is the single representative species of the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family [1]. SVA has been associated with vesicular disease in pigs of the United States [2], Brazil [3–6], and China [7]. In 2015, high rates of pig neonatal mortality associated with SVA infection have been reported in these countries; however the pathogenicity of this virus is not completely elucidated.

Different studies used quantitative RT-PCR (qRT-PCR) for the SVA detection and quantification [2,8–13]; however only one describes the technique in details [13]. The development and validation of diagnostic techniques are necessary to identify the virus presence and/circulation, for retrospective and prospective epidemiological studies, and to determine the naive status of experimental animals [14]. In this study a TaqMan-based qRT-PCR assay was designed and validated for SVA RNA detection and quantification in porcine tissue specimens.

The primers and probe were designed and compared among each other and with other SVA representative nucleotide (nt) sequences available in GenBank using the Primer Express Software (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The primer and probe positions were defined based on the prototype SVV-01 (GenBank accession number NC_011349). The primers SVV-q2688Fw (5'-CACCGACAACGCCGAGAC-3') and SVV-q2782Rv (5'-GAGATCGATCAAACAGGAACTTGAC-3') were designed to amplify a 118 bp length fragment of a conserved genomic region within the VP1 protein of the SVA. The probe was defined as SVV-q2728Pb (5'-FAM-ACTGACACCGATTTC-MGB-3') (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The primer and probe specificities were tested *in silico*, using other picornavirus nt sequences available in GenBank [3].

A fragment of the 118 bp was amplified by conventional RT-PCR using the primers SVV-q2688Fw and SVV-q2782Rv from a fluid vesicular SVA isolate [3]. The RT reaction was performed with SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacture's instructions and using 40 pmol of SVV-q2782Rv primer. The PCR assay and amplification reaction were performed as described previously [3], using 20 pmol of each primer (forward and reverse) and 55°C/1 min for annealing.

* Corresponding author.

E-mail address: alfieri@uel.br (A.A. Alfieri).

The amplicon was cloned into the pCR™ 4-TOPO® (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) vector, according to the manufacturer's instructions. The clone containing the target sequence was confirmed by sequencing. The quantitation was determined by Qubit® Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA). The DNA copy number was calculated using the equation $(X \text{ (g/}\mu\text{L)})/[\text{clone size in bp} \times 649] \times 6.022 \times 10^{23} = n \text{ copies/}\mu\text{L}$ (Invitrogen™ Life Technologies).

The qRT-PCR was performed using the SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The reactions were performed in final solutions of 25 μL containing 12.5 μL 2X Reaction Mix, 50 nM of Rox™ Reference Dye, 0.5 μL of the SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix, and 5 μL of the genomic template. Gradient solutions were used for the optimization of the primer (300 nM–800 nM) and probe (50 nM–250 nM) concentrations. The final concentrations for each primer and probe were defined as 400 nM and 250 nM, respectively. The cycling conditions

were 50°C/15 min, 95°C/2 min, followed by 40 cycles of 95°C/15 s and 60°C/30 s. Sterile ultrapure water was used as negative control in each reaction.

Tenfold serial dilutions of the SVA clone containing 1.3×10^8 to 1.3×10^0 copies/ μL were prepared with UltraPure™ diethylpyr-carbonate (DEPC)-treated water (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Each aliquot was used once in each assay for the construction of the standard curve by plotting the quantification cycle (Cq) and the plasmid copy number logarithm.

The limit of detection (LOD) of the qRT-PCR assay was determined using tenfold dilutions of the SVA clone containing 1.3×10^8 to 1.3×10^0 copies/ μL . All dilutions were tested in the qRT-PCR in three different times and in duplicate to determine the coefficient of variation (CV). The intra- and inter-assay CVs for Cq values were calculated for each dilution of the standard curve. Conventional RT-PCR assays with primers q2688Fw and q2782Rv were also performed for each SVA clone dilution for comparison purposes. The LOD and sensitivity of the technique was also evaluated by the SVA genome recovery from biological samples that might contain

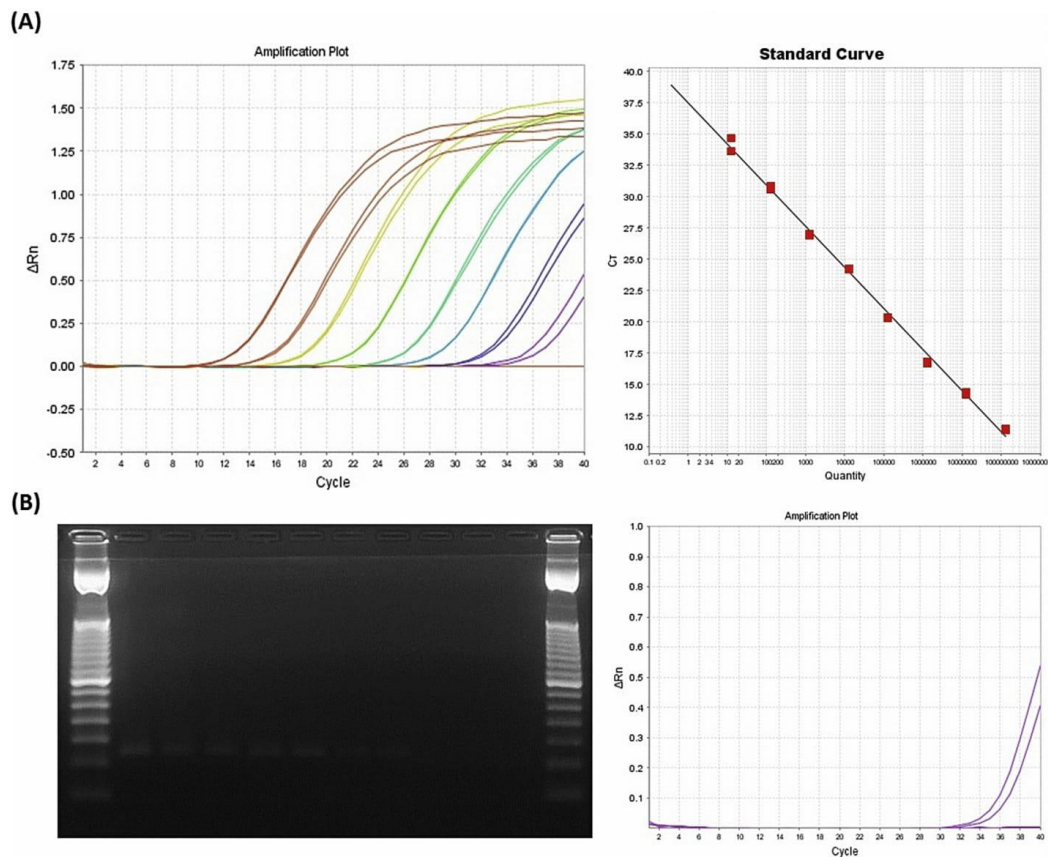


Fig. 1. (A) Amplification curves of TaqMan-based qRT-PCR assay using duplicated tenfold serial dilutions (10^8 to 10^0 copies/ μL) of SVA clone genomic template; $y = -3.289$; $R^2 = 0.997$; $E = 101.37\%$. (B) Limit of detection of the conventional RT-PCR assay. Left: Lanes 1 and 12 = 100 bp DNA ladder, Lanes 2–10 = serial dilutions (1.3×10^8 to 1.3×10^0 copies/ μL) of the SVA clone, Lane 11 = negative control; Right: Amplification curve of TaqMan-based qRT-PCR assay from the 10^1 and 10^0 dilutions (13 and 1.3 copies/ μL) of the SVA clone.

potential reaction inhibitors. SVA clone was spiked into lung tissues that were collected in 2011 from 2 SVA-negative pigs and then submitted to the nucleic acid extraction [3,15,16]. Following, the extracted nucleic acid was tenfold diluted; 5 μ L of each dilution was used in the qRT-PCR assay herein, which was done in triplicate.

The qRT-PCR herein was evaluated for the SVA detection in clinical samples. The specimens included in this analysis were selected based on piglet health status and on results of a conventional RT-PCR assay for SVA detection. All samples were received between June, 2015 and January, 2016 for routine diagnosis purposes and were stored at -80°C .

Organ fragments ($n = 38$) of 15 one-week-old symptomatic piglets were included. Five piglets were SVA-positive and the other 10 animals were SVA negative by conventional RT-PCR assay [3].

Other 7 tissue samples of 4 asymptomatic piglets at the same age were included. These piglets originated from pig herds with no consistent SVA-associated clinical signs and all were SVA negative in conventional RT-PCR [6].

Tissue samples homogenates and nucleic acid extraction were performed as described [3,15,16]. The qRT-PCR reactions and the standard curves were conducted in triplicates for all the samples.

The Cq values for the SVA clone ranged from 11.7 to 33.9 cycles. Based on the standard curve duplicates the linear correlation (R^2) was of 0.997; the slope between the Cq value and the logarithm of the SVA clone copy number was of -3.289 ; amplification efficiency was of 101.37% (Fig. 1A).

The LOD of the qRT-PCR for the SVA clone was of 13 genomic copies/ μ L. However, the conventional RT-PCR assay for SVA clone dilutions presented LOD of approximately 130 genomic copies/ μ L (Fig. 1B). The inter-assay qRT-PCR did not show repeatability in the standard curves for the 1.3×10^0 duplicate dilutions of the SVA clone. No changes in fluorescence were observed in the negative control. Reproducibility was measured by determining CVs of the

intra- and inter-assays for each concentration of the standard curve tested in the qRT-PCR. The intra-assay CVs ranged from 0.21 to 2.02%, while the inter-assay CVs ranged from 0.46 to 4.52% (Table 1). The qRT-PCR sensitivity from biological samples spiked with SVA clone was of 1.3×10^1 genomic copies in all the triplicates of both porcine lung tissue samples. The extraction and reaction negative controls did not show fluorescence signs.

The *in silico* analyses of primer set did not reveal annealing with any of the evaluated picornaviruses. The qRT-PCR assay herein did not show strong fluorescent signals for the pig fecal samples previously known as positive for *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, *Enterovirus G* [17], and/or *Aichivirus C* [18], as well as for the negative control.

The 5 piglets that were known as positive for SVA in the conventional RT-PCR also presented positive results for the virus in the qRT-PCR. Among the 10 symptomatic piglets that have been SVA-negative in the conventional RT-PCR, 5 were detected with the virus in the qRT-PCR assay. Tissue samples of the 4 piglets with no consistent clinical manifestations of SVA infection presented negative results in the qRT-PCR assay herein.

Comparisons of techniques used herein revealed that 30/38 (78.9%) and 18/38 (47.4%) of the samples were positive for SVA in the qRT-PCR and conventional RT-PCR, respectively. All the conventional RT-PCR-positive samples were also positive in the qRT-PCR. For the tissue samples that were positive in both qRT-PCR and conventional RT-PCR assays, the Cq values ranged of 12–32.3 cycles. The tissue samples that presented positive results exclusively in the qRT-PCR showed Cq values ranging of 27.6–36.8 cycles (Table 2).

We describe the development and validation a novel qRT-PCR assay for the SVA detection using hydrolysis probes for the conserved region within the VP1 gene of the virus genome. The primer and probe sets have shown to be specific, with no cross-reaction with the other virus agents tested herein in both *in silico* and/or qRT-PCR analyses. The low intra- and inter-assay CV values of the qRT-PCR indicated that this assay was able to generate reproducible and reliable results. In addition, piglets with no clinical evidence of SVA infection presented negative results, showing the specificity of the qRT-PCR assay developed.

Our qRT-PCR assay was able to detect up to 13 copies/ μ L (1.3×10^1) of the SVA clone, revealing that this is a sensitive molecular diagnostic technique. The sensitivity of the qRT-PCR assay herein was also evident when compared with conventional RT-PCR assay, which was able to detect approximately 130 (1.3×10^2) copies/ μ L of the SVA clone.

The qRT-PCR assay was also validated in clinical specimens from symptomatic and asymptomatic piglets. The comparison of results showed that the qRT-PCR assay has increased sensitive and efficiency than the conventional RT-PCR, since it was able to recover 5

Table 1
Reproducibility of intra- and inter-assay qRT-PCR for *Senecavirus A* detection.

SVA clone copies/ μ L	Cq mean	Intra-assay		Inter-assay	
		SD	%CV	SD	%CV
1.3×10^8	11.75	0.10	0.93	0.33	2.88
1.3×10^7	14.48	0.15	1.07	0.25	1.74
1.3×10^6	16.94	0.14	0.85	0.76	4.52
1.3×10^5	20.19	0.05	0.26	0.37	1.83
1.3×10^4	24.08	0.05	0.21	0.17	0.73
1.3×10^3	26.76	0.11	0.42	0.16	0.61
1.3×10^2	30.43	0.21	0.69	0.25	0.84
1.3×10^1	33.98	0.69	2.02	0.15	0.46
1.3×10^0	–	–	–	–	–

SD = Standard deviation.

%CV = Percentage of coefficient variation.

Table 2
Detection of *Senecavirus A* (SVA) from different symptomatic piglet tissue samples by conventional and quantitative RT-PCR assays and quantification cycle ranges according to the tissues.

Tissues	Number of samples	Number of SVA positive samples		SVA Cq range	
		Conventional RT-PCR	qRT-PCR	Positive samples in both qRT-PCR and conventional RT-PCR	Positive samples exclusively in qRT-PCR
Lung	8	4	5	15.97–28.01	35.18
Heart	7	3	4	21.67–24.34	28.76
Urinary bladder	7	3	7	22.53–28.26	31.83–34.29
Kidney	5	3	4	20.3–28.64	35.24
Spleen	4	2	4	21.35–30.04	27.66–29.8
Tonsils	4	2	3	12.04–28.92	28.44
Small intestine	3	1	3	28.09–32.31	36.85
TOTAL	38	18	30	12.04–32.31	27.66–36.85

piglets and 12 tissue samples that were negative in the conventional RT-PCR assay. This statement is supported by the higher Cq values observed in tissue samples that presented positive results exclusively in the qRT-PCR, revealing that the conventional RT-PCR assay is not sufficiently sensitive to detect SVA in samples with low virus loads. A previous study suggested that SVA RNA is more likely to be detected in pulmonary and myocardial tissues [5]. The qRT-PCR Cq ranges obtained herein suggest that tissues of tonsils should also be selected. However, further studies based on SVA loads in different tissues are needed.

In conclusion, the qRT-PCR assay in this study demonstrated high sensitivity, specificity, and accuracy for detection and quantification of SVA. SVA is associated with a novel multisystemic syndrome in neonatal piglets; it is not known whether there is a principal tissue/organ targeted by the virus. The development of quantitative based-diagnostic technique for SVA infection is of value to provide knowledge on the virus biological properties, including virus-host interactions, SVA loads in different organs, differentiation of active or persistent infection, and establishing of infection dynamics and clinical disease progress. This qRT-PCR assay is proposed as tool for diagnosis and further comprehension of SVA-associated disease.

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: CNPq, CAPES, FINEP, and FAP/PR. Alfieri, AF, Alfieri, AA, Leme, RA, and Dall Agnol, AM are recipients of CNPq fellowships.

Conflict of interest

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

References

- [1] ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses, Virus Taxonomy: 2015 Release, 2015. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (accessed 16.06.06).
- [2] B.M. Hause, O. Myers, J. Duff, R.A. Hesse, Senecavirus a in pigs, United States, 2015, *Emerg. Infect. Dis.* 22 (2016) 1323–1325.
- [3] R.A. Leme, E. Zottli, B.K. Alcantara, M.V. Oliveira, L.A. Freitas, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds, *Transbound. Emerg. Dis.* 62 (2015) 603–611.
- [4] R.A. Leme, T.E. Oliveira, B.K. Alcantara, S.A. Headley, A.F. Alfieri, M. Yang, A.A. Alfieri, Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015, *Emerg. Infect. Dis.* 22 (2016) 1238–1241.
- [5] R.A. Leme, T.E. Oliveira, A.F. Alfieri, S.A. Headley, A.A. Alfieri, Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets, *J. Comp. Pathol.* 155 (2016) 145–155.
- [6] F.A. Vannucci, D.C. Linhares, D.E. Barcellos, H.C. Lam, J. Collins, D. Marthaler, Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil, *Transbound. Emerg. Dis.* 62 (2015) 589–593.
- [7] Q. Wu, X. Zhao, Y. Bai, B. Sun, Q. Xie, J. Ma, The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China, *Transbound. Emerg. Dis.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12557>.
- [8] L.G. Gimenez-Lirola, C. Rademacher, D. Linhares, K. Harmon, M. Rotolo, Y. Sun, D.H. Baum, J. Zimmerman, P. Pineyro, Serological and molecular detection of Senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality, *J. Clin. Microbiol.* 54 (2016) 2082–2089.
- [9] A.J. Bracht, E.S. O'Hearn, A.W. Fabian, R.W. Barrette, A. Sayed, Real-Time reverse transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens, *PLoS One* 11 (2016) e0146211.
- [10] P. Canning, A. Canon, J.L. Bates, K. Gerardy, D.C. Linhares, P.E. Pineyro, K.J. Schwartz, K.J. Yoon, C.J. Rademacher, D. Holtkamp, L. Karriker, Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a U.S. sow farm, *Transbound. Emerg. Dis.* 63 (2016) 373–378.
- [11] N. Montiel, A. Buckley, B. Guo, V. Kulshreshtha, A. VanGeelen, H. Hoang, C. Rademacher, K. Yoon, K. Lager, Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with Senecavirus A, *Emerg. Infect. Dis.* 22 (2016) 1246–1248.
- [12] L.R. Joshi, M.H.V. Fernandes, T. Clement, S. Lawson, A. Pillatzki, T.P. Resende, F.A. Vannucci, G.F. Kutish, E.A. Nelson, D.G. Diel, Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs, *J. Gen. Virol.* 97 (2016) 3267–3279.
- [13] V.L. Fowler, R.H. Ransburgh, E.G. Poulsen, J. Wadsworth, D.P. King, V. Mioulet, N.J. Knowles, S. Williamson, X. Liu, G.A. Anderson, Y. Fang, J. Bai, Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs, *J. Virol. Methods* 239 (2017) 34–37.
- [14] J. Segales, D. Barcellos, A. Alfieri, E. Burrough, D. Marthaler, Senecavirus A: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs? *Vet. Pathol.* (2016) <http://dx.doi.org/10.1177/0300985816653990>.
- [15] R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 495–503.
- [16] A.A. Alfieri, M.E. Parazzi, E. Takiuchi, K.C. Medici, A.F. Alfieri, Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002, *Trop. Anim. Health Prod.* 38 (2006) 521–526.
- [17] D.G. Donin, R.A. Leme, A.F. Alfieri, G.C. Alberton, A.A. Alfieri, First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil, *Trop. Anim. Health Prod.* 46 (2014) 523–528.
- [18] J. Ribeiro, R.A. Leme, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, High frequency of Aichivirus C (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil, *Trop. Anim. Health Prod.* 45 (2013) 1757–1762.



BRIEF REPORT

Quantitative analysis of senecavirus A in tissue samples from naturally infected newborn piglets

Alais Maria Dall Agnol^{1,3} · Flavia Megumi Miyabe^{1,3} · Raquel Arruda Leme^{1,3} · Thalita Evani Silva Oliveira² · Selwyn Arlington Headley² · Amauri Alcindo Alfieri^{1,3} · Alice Fernandes Alfieri^{1,3}

Received: 21 July 2017 / Accepted: 10 October 2017 / Published online: 13 November 2017
© Springer-Verlag GmbH Austria 2017

Abstract In this study, we determined the distribution of senecavirus A (SVA) and viral RNA load in different organs and tissues of naturally infected piglets. A TaqMan-based qRT-PCR assay was performed using RNA extracted from brainstem, cerebellum, cerebrum, heart, kidney, liver, lungs, small intestine, spleen, urinary bladder, and tonsils of seven newborn piglets. SVA was detected in 57 out of 70 tissue samples (81.4%). Viral loads ranged from 4.07 to 10.38 log₁₀ genomic copies per g of tissue. The results show that SVA has tropism for various organs in naturally infected newborn piglets, especially for tonsils, spleen, lungs, and liver. Lymphoid organs had the highest viral loads and may be important sites for SVA replication.

Keywords Swine · SVA · Multisystemic infection · qRT-PCR · Viral load

Senecavirus A (SVA) is the only member of the genus *Senecavirus*, family *Picornaviridae*. SVA is a single-stranded, positive-sense, non-enveloped RNA virus with a genome size of approximately 7.2 kb [6]. The virus has been circulating in pig herds of the United States since 1988 [6]. However, recent reports have revealed that SVA-associated disease has emerged in other countries, including Brazil, China, and Thailand [8, 11, 15, 17, 18].

SVA infection has been associated with vesicular disease in weaned, finishing, and adult pigs under natural [3, 8, 16] and experimental conditions [7, 12]. It has been demonstrated that the virus is able to spread to other internal organs without producing other clinical manifestations [7]. In piglets, SVA infection has also been associated with diarrhea and high mortality rates [9, 10, 17]. SVA can be identified in different organs and tissues of newborn piglets using techniques such as molecular [3, 5, 8], immunohistochemical (IHC) [9, 10], and/or *in situ* hybridization [13] assays. Although quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assays have been used to detect the SVA genome in organ samples from piglets [11], there are no reports of the SVA RNA loads in tissues of newborn piglets with clinical signs consistent with a multisystemic SVA infection.

The aim of this study was to analyze the distribution of SVA and RNA loads in different organ and tissue samples from symptomatic piglets in vesicular-disease-affected pig herds.

Biological samples from piglets included in this study were collected between March and December of 2015 from seven pig herds located in the Paraná and Santa Catarina states of southern Brazil. All seven pig herds contained pigs exhibiting clinical signs consistent with SVA infection. These included the occurrence of vesicular lesions in adult animals, as well as diarrhea and high rates of neonatal mortality in piglets.

Handling Editor: Zhenhai Chen.

✉ Amauri Alcindo Alfieri
alfieri@uel.br

- ¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, PO Box 10011, Paraná, CEP 86057-970, Brazil
- ² Laboratory of Animal Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, PO Box 10011, Paraná, CEP 86057-970, Brazil
- ³ Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, PO Box 10011, Paraná, CEP 86057-970, Brazil

Table 1 Geographical origin and age of piglets and clinical signs

Piglet no.	Brazilian state	Age (days)	Principal clinical signs
1	Santa Catarina	5	Diarrhea
2	Santa Catarina	5	Diarrhea, wasting
3	Santa Catarina	2	Diarrhea, neurological signs
4	Santa Catarina	7	Diarrhea, wasting
5	Santa Catarina	3	Diarrhea
6	Paraná	2	Diarrhea, wasting, neurological signs
7	Paraná	2	Diarrhea, neurological signs

Organs and tissues from newborn piglets from these herds that had died spontaneously were submitted for routine SVA diagnosis using a conventional RT-PCR assay for the amplification of a portion of the VP3/VP1 gene region [8]. SVA-positive piglets originating from different herds and from which a variety of organ/tissue samples had been collected were selected to determine the tissue distribution and load of SVA RNA. Table 1 presents the epidemiological data for the piglets included in this analysis. According to the consulting veterinarians, piglets 1, 3, 5, 6, and 7 showed severe clinical signs that resulted in death within 1 to 3 days after the onset of clinical manifestations. Mortality rates in most herds ranged from 20 to 30%, while in the herds from which piglets 2 and 4 originated, the mortality rate was lower (3 to 5%).

Tissue fragments from the central nervous system (brainstem, cerebellum, and cerebrum), heart, kidney, liver, lungs, and spleen from the seven newborn piglets were selected for analysis by qRT-PCR. However, fragments of the small intestine and urinary bladder of only five piglets (no. 1, 2, 3, 4, and 5) and the tonsils from four piglets (no. 1, 2, 3, and 5) were available. A total of 70 tissue samples were analyzed.

Two swabs of recently ruptured vesicles from sows were included in the SVA RNA load analysis. In addition, four asymptomatic piglets from herds with no clinical history of SVA-associated disease were included in this survey as negative controls. Heart ($n = 4$), spleen ($n = 4$), and kidney ($n = 3$) tissue samples were available from these piglets. In addition, histopathological and IHC analyses were performed as described previously [9, 10] for all of the piglet tissue samples included in this study.

Suspensions (10% w/v) were prepared from a 100-mg portion of each tissue sample, which was mechanically disrupted (MagNa Lyser Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2, and clarified by centrifugation at $2,000 \times g$ for 10 min. Nucleic acid extraction was performed on 250- μ l aliquots of the tissue/swab suspensions that had been pre-treated with proteinase K,

using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods [1, 2]. The extracted nucleic acids were eluted in 50 μ l of UltraPure™ DEPC-treated water (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80°C . Sterile ultrapure water was used as a negative control in all of the nucleic acid extractions and subsequent procedures.

The SVA RNA distribution and loads in the biological samples were determined using a TaqMan-based qRT-PCR assay designed to amplify 118 bp of a conserved genomic fragment within the region encoding the SVA VP1 protein. The qRT-PCR assay was performed using a SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A standard curve was generated using tenfold serial dilutions of a cloning vector with the target amplicon containing 1.3×10^8 to 1.3×10^0 copies/ μ l according to Dall Agnol et al. [4]. All reactions, including those for the samples from asymptomatic piglets and swabs of recently ruptured vesicles, were conducted in triplicate.

The principal histopathological findings observed were alveolar congestion (6/7), random lymphoplasmacytic hepatitis (4/7), pulmonary edema (3/7), and ballooning degeneration of the epithelium of the bronchus and bronchiole (3/7) (Fig. 1). Choroid plexus and renal pelvis were available only in the cerebrum and kidney tissues, respectively, of five piglets. There was congestion of the capillaries (5/5) and ballooning degeneration of the epithelial cells of choroid plexus (2/5). Furthermore, there was ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder and of the epithelium of the renal pelvis (5/5), severe hyperplasia (involving 3 to 13 layers of epithelial cells) of the urothelium of the renal

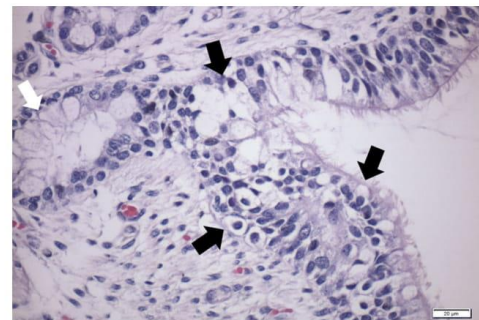


Fig. 1 Histopathological findings observed in newborn piglets naturally infected by SVA. In the lung, there is moderate ballooning degeneration of the respiratory epithelium resulting in displacement of nuclei to the periphery (black arrows); compare this with normal goblet cells (white arrow). Hematoxylin & Eosin stain. Bar, 20 μ m

pelvis, ureters and urinary bladder (3/5), and atrophic enteritis (5/5) and necrosis of apical enterocytes (3/5). Vacuolization of the apical enterocytes was observed in fewer than half (2/5) of the piglets with atrophic enteritis.

No SVA antigens or RNA were detected in any tissue samples collected from asymptomatic piglets, and all of the qRT-PCR-negative tissue samples obtained from symptomatic piglets were also negative for SVA antigens in the IHC assay. The vesicular lesion swabs from sows contained SVA RNA loads of 8.99 and 11.13 \log_{10} genomic copies/ml. SVA RNA was detected by the qRT-PCR assay in 81.4% (57/70) of the tissue samples from symptomatic newborn piglets, with SVA loads varying from 4.07 to 10.38 \log_{10} genomic copies per g of tissue. On the other hand, SVA antigens were detected in 27.1% (19/70) of the tissue samples from symptomatic piglets. The organs that were positive for SVA in both qRT-PCR and IHC assays were cerebellum (4/7), cerebrum (2/7), kidney (4/7), small intestine (4/5), urinary bladder (3/5), and tonsils (2/4) (Table 2).

The results of this study show that SVA infection was distributed among the different organs analyzed, including tissues of the central nervous system. The qRT-PCR assay proved to be a sensitive technique that provided information about the viral distribution and loads in different tissue samples. Considering the SVA tissue distribution results and the fact that the piglets included in this study were no more than 7 days old, this study

demonstrates that dissemination of SVA to different organs occurs rapidly in naturally infected newborn piglets, leading to a multisystemic infection.

Notably, higher SVA loads were observed in piglets 1, 3, 5, 6, and 7, which were the animals that exhibited severe clinical signs and were from herds with high rates of neonatal piglet mortality. These results provide evidence of the participation of SVA in the observed clinical manifestations. Analysis of the SVA load in each organ revealed that lymphoid tissues, such as the tonsils and spleen, had higher viral loads than other organs. However, the IHC results revealed the absence of SVA antigens in all of the spleen samples and in one (piglet no. 1) of the three tonsil tissue samples available from these piglets. Histopathological analysis of the tonsils of piglet no. 1 also did not reveal tissue alterations. However, hydropic degeneration (ballooning degeneration) and lymphoid depletion were observed in tissues of tonsils from piglets 3 and 5 (Fig. 2). The histopathological evaluation of the spleen of young piglets is not a suitable approach, since at this age, this organ is not completely developed [14]. However, a spleen sample from one of the piglets (no. 6) included in this study had previously been subjected to attempts at viral isolation in another study [8] (data not shown), and the SVA was successfully isolated from this piglet spleen after three sequential passages in PK-15 cells, demonstrating that it was indeed infected and that the IHC had given a false-negative result.

Table 2 Senecavirus A (SVA) antigen detection and RNA tissue quantification in different organ samples from naturally infected newborn piglets by immunohistochemistry (IHC) and TaqMan-based qRT-PCR, respectively

Organ/tissue	Piglet number													
	1		2		3		4		5		6		7	
	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR	IHC	qRT-PCR
Brainstem	-	0	-	0	-	6.67	-	0	-	5.92	-	7.31	-	7.27
Cerebellum	+	5.59	-	0	-	0	+	4.57	-	6.72	+	7.20	+	7.16
Cerebrum	+	5.55	-	0	+	5.54	-	0	-	6.72	-	6.37	-	7.32
Heart	-	7.84	-	4.25	-	7.13	-	5.28	-	7.93	-	8.00	-	8.09
Kidney	+	7.94	-	0	+	7.30	+	5.45	+	8.73	-	8.89	-	8.89
Liver	-	7.98	-	0	-	8.85	-	6.01	-	9.19	-	8.40	-	7.96
Lungs	-	8.05	-	0	-	9.96	-	6.78	-	9.06	-	9.51	-	9.44
Small intestine	+	6.50	-	0	+	7.54	+	6.42	+	8.48	NC	NC	NC	NC
Urinary bladder	+	6.52	-	4.07	+	7.21	-	4.07	+	7.35	NC	NC	NC	NC
Spleen	-	8.14	-	0	-	8.73	-	6.97	-	9.84	-	9.12	-	10.21
Tonsils	-	6.74	-	0	+	8.69	NC	NC	+	10.38	NC	NC	NC	NC

IHC: Immunohistochemistry

qRT-PCR: SVA RNA quantification (\log_{10} genomic copies per g of tissue)

+: Positive

-: Negative

NC: not collected

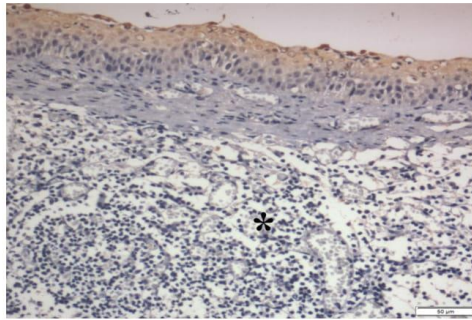


Fig. 2 Immunohistochemical detection of SVA antigens in newborn piglets. A sample of the oral mucosa with tonsil tissue is shown. Positive immunolabelling of the mucosal epithelium is visible within areas of hydropic degeneration and lymphoid depletion (*) of the tonsil. Immunoperoxidase. Bar, 50 μ m

Likewise, the IHC assay from the lungs was not able to detect SVA antigens in these organ tissues, even in the cases with evident histopathological changes and high SVA RNA loads. Clinical signs of respiratory disease in these piglets were not reported, but it is possible that, due to the rapid progression of the illness, with the death of the animals occurring within 72 h, there had not been time for the manifestation of respiratory disease or even that it had not been noticed by the consulting veterinarians. Although negative immunostaining from tissues of damaged lungs obtained from SVA-infected piglets has been reported previously [10], and considering that a previous study showed the ability of SVA to replicate in lung cells [13], the possibility that the presence of SVA in the lungs of infected piglets with ballooning degeneration of the epithelium of the bronchus and bronchiole was underestimated due to the low sensitivity of the IHC assay used here cannot be excluded. However, further studies are needed to establish the clinical consequences of SVA infection in lungs of piglets.

SVA RNA loads in liver, lung, spleen, and tonsil tissues of most of the piglets ranged from 9.06 to 10.38 \log_{10} genomic copies per g of tissue, while the viral loads in the vesicular lesion swabs ranged from 8.99 to 11.13 \log_{10} genomic copies per ml. These results show that the SVA loads, specifically in these tissues, were high. Although other organs such as lymph nodes and large intestine were not included in this survey, these results are in agreement with an experimental SVA infection study in 4-month-old pigs, which revealed high viral loads in tonsil, spleen, lung, and liver tissues [7]. In the present study, the SVA loads in these tissues were higher than in the experimental SVA-based study. This is likely to be due to the natural conditions of infection and the age of the affected animals.

These results suggest that SVA may have a tissue tropism for these organs in piglets. A previous study suggested that tonsils are the primary site for SVA replication during the acute stage of infection in 4-month-old pigs [7]. With the highest SVA loads in newborn piglets found in the tonsils, this hypothesis is also corroborated for young animals. Together, the results from both studies reveal an important biological property of the virus.

SVA infection has been associated with two different clinical manifestations depending on the age of the affected pigs. In weaned, finishing, and breeder (sows and boars) animals, the infection is associated with vesicular disease. In newborn piglets, the reported clinical manifestations of SVA infection include diarrhea, neurological signs, and sudden death, as was observed in the piglets evaluated in this study. These differences may be related to the infection conditions (natural vs. experimental), the age of the infected animals, and/or their individual capability to produce an immunological response. We speculate that newborn piglets are more susceptible to SVA infection, and therefore, the systemic clinical manifestations with high viral loads in various organs/tissues are more evident in these animals.

Samples from piglet no. 2 yielded negative IHC and qRT-PCR results for all organs, with the exception of tissues from the urinary bladder and heart, which had the lowest SVA loads of 4.07 and 4.25 \log_{10} genomic copies per g, respectively. This piglet had no clinical signs other than severe diarrhea and wasting, and low mortality rates were reported in its herd of origin. The histopathological analysis revealed vacuolization of enterocytes, necrosis of apical enterocytes, and atrophy and fusion of villi. Fecal samples from all piglets in this study were screened for porcine rotaviruses (RV) A, B, C, and H by RT-PCR assay (data not shown), and RVB RNA was amplified only from the diarrhetic fecal sample of piglet no. 2. Considering the histopathological lesions, the negative IHC and qRT-PCR results, and the molecular detection of RVB, it is likely that the enteric disease presented by this piglet may have been related to RVB infection.

This is the first study that presents a quantitative analysis of SVA in tissue fragment samples of naturally infected, newborn piglets with systemic clinical signs. It was shown that SVA can be distributed among different organs in piglets and that lymphoid organs contained the highest viral loads, followed by the lungs and liver. Therefore, these factors should be considered when selecting biological samples for SVA diagnosis. The qRT-PCR assay is more sensitive than IHC and therefore, should be the preferred screening method for SVA, although it cannot be used to determine the location of infected cells in the tissue. Additional methods, including the IHC, with the capability to detect specific viral antigens or nucleic acid within the

damaged tissue, may be useful to associate the presence of the pathogen with the disease. However, we recommend caution in interpreting results that cannot be confirmed by molecular assays. Further studies involving SVA infection in newborn piglets should be conducted to elucidate the biological properties of the virus in animals within this age group, especially to determine whether the SVA infection is associated with other reported clinical manifestations, such as neurological signs, diarrhea, and sudden death or with histopathological changes in the lungs.

Acknowledgements The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: CNPq, CAPES, FINEP, and FAP/PR. Alfieri, AF, Alfieri, AA, Headley, S.A., Oliveira TES, Leme, RA, and Dall Agnol, AM are recipients of CNPq fellowships.

Compliance with ethical standards

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

Funding This study was funded by CNPq (Grant number 150346/2017-4).

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

References

- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop Anim Health Prod* 38:521–526. <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503
- Canning P, Canon A, Bates JL, Gerardy K, Linhares DC, Pineyro PE, Schwartz KJ, Yoon KJ, Rademacher CJ, Holtkamp D, Karriker L (2016) Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with senecavirus A in a US sow farm. *Transbound Emerg Dis* 63:373–378. <https://doi.org/10.1111/tbed.12516>
- Dall Agnol AM, Otonel RA, Leme RA, Alfieri AA, Alfieri AF (2017) A TaqMan-based qRT-PCR assay for senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets. *Mol Cell Probes* 33:28–31. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.03.002>
- Gimenez-Lirola LG, Rademacher C, Linhares D, Harmon K, Rotolo M, Sun Y, Baum DH, Zimmerman J, Pineyro P (2016) Serological and molecular detection of senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality. *J Clin Microbiol* 54:2082–2089. <https://doi.org/10.1128/jcm.00710-16>
- Hales LM, Knowles NJ, Reddy PS, Xu L, Hay C, Hallenbeck PL (2008) Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J Gen Virol* 89:1265–1275. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83570-0>
- Joshi LR, Fernandes MH, Clement T, Lawson S, Pillatzki A, Resende TP, Vannucci FA, Kutish GF, Nelson EA, Diel DG (2016) Pathogenesis of senecavirus A infection in finishing pigs. *J Gen Virol* 97:3267–3279. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000631>
- Leme RA, Zotti E, Alcantara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, Alfieri AA (2015) Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transbound Emerg Dis* 62:603–611. <https://doi.org/10.1111/tbed.12430>
- Leme RA, Oliveira TE, Alcantara BK, Headley SA, Alfieri AF, Yang M, Alfieri AA (2016) Clinical manifestations of senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis* 22:1238–1241. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151583>
- Leme RA, Oliveira TE, Alfieri AF, Headley SA, Alfieri AA (2016) Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets. *J Comp Pathol* 155:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.011>
- Leme RA, Alfieri AF, Alfieri AA (2017) Update on senecavirus infection in pigs. *Viruses* 9:E170. <https://doi.org/10.3390/v9070170>
- Montiel N, Buckley A, Guo B, Kulshreshtha V, VanGeelen A, Hoang H, Rademacher C, Yoon KJ, Lager K (2016) Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with senecavirus A. *Emerg Infect Dis* 22:1246–1248. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151863>
- Resende TP, Marthaler DG, Vannucci FA (2017) A novel RNA-based in situ hybridization to detect Seneca Valley virus in neonatal piglets and sows affected with vesicular disease. *PLoS One* 12:e0173190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173190>
- Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M, Domingo M (2004) Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 99:203–213. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.02.001>
- Saeng-Chuto K, Rodtian P, Temecyasan G, Wegner M, Nilubol D (2017) The first detection of senecavirus A in pigs in Thailand, 2016. *Transbound Emerg Dis*. <https://doi.org/10.1111/tbed.12654>
- Segales J, Barcellos D, Alfieri A, Burrough E, Marthaler D (2017) Senecavirus A. *Vet Pathol* 54:11–21. <https://doi.org/10.1177/0300985816653990>
- Vannucci FA, Linhares DC, Barcellos DE, Lam HC, Collins J, Marthaler D (2015) Identification and complete genome of Seneca Valley Virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. *Transbound Emerg Dis* 62:589–593. <https://doi.org/10.1111/tbed.12410>
- Wu Q, Zhao X, Bai Y, Sun B, Xie Q, Ma J (2017) The first identification and complete genome of senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. *Transbound Emerg Dis* 64:1633–1640. <https://doi.org/10.1111/tbed.12557>

4 CONCLUSÕES

709

710

711 CONCLUSÕES

712

- 713 • A técnica de qRT-PCR desenvolvida nesse estudo apresenta-se como uma excelente
714 ferramenta para o diagnóstico da infecção e compreensão da patogenia da doença
715 associada ao vírus, devido à alta sensibilidade, especificidade e acurácia para a detecção
716 e a quantificação de SVA a partir de amostras biológicas.
- 717 • A ampla distribuição de RNA de SVA em órgãos/tecidos dos sistemas cardiovascular,
718 respiratório, digestório, urinário, neurológico e linfático demonstra a capacidade do
719 vírus em causar infecção multissistêmica em leitões recém-nascidos, bem como a sua
720 participação nas manifestações clínicas observadas.
- 721 • A maior carga viral quantificada em baço e tonsilas, em relação aos demais órgãos
722 avaliados, sugere que estes tecidos linfoides são órgãos/tecidos de eleição para a
723 replicação viral em leitões recém-nascidos.
- 724 • Devido às altas cargas virais identificadas, órgãos linfoides, pulmões e fígado devem ser
725 considerados de eleição na seleção de amostras biológicas para diagnóstico molecular
726 de SVA.
- 727 • A técnica de qRT-PCR foi mais sensível que a imuno-histoquímica e deve ser o método
728 de eleição para o diagnóstico de SVA.
- 729 • A padronização da técnica de qRT-PCR utilizando *TaqMan* possibilitou o
730 desenvolvimento de um teste de diagnóstico molecular rápido, com alta repetibilidade,
731 sensibilidade e especificidade tanto para a detecção quanto para a quantificação de RNA
732 de SVA em tecidos de suínos naturalmente infectados.

5.1 Lista de Reagentes

733

734

735

Lista de Reagentes

736

- 737 1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
- 738 2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
- 739 3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
- 740 4. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen[®])
- 741 5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
- 742 6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{2H}_2\text{O}$) P.M.
- 743 372,24 (Reagen[®])
- 744 7. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
- 745 8. Água DEPC (Diethyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
- 746 9. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
- 747 10. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
- 748 11. Anti-Anti 100x (Gibco[®])
- 749 12. Anticorpos (E-caderina e Ki-67) (Zymed[®])
- 750 13. Bicarbonato de sódio, P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
- 751 14. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems[®])
- 752 15. Brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
- 753 16. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
- 754 17. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
- 755 18. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
- 756 19. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
- 757 20. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
- 758 21. DAB (Invitrogen Life Technologies[™])
- 759 22. Dimetil sulfóxido (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Sigma[®])
- 760 23. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
- 761 24. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies[™])
- 762 25. DNA Ladder (100 pb) (Invitrogen Life Technologies[™])
- 763 26. DNA Ladder (50 pb) (Invitrogen Life Technologies[™])

- 764 27. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μ L; 25 μ mol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP
765 Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life
766 TechnologiesTM)
- 767 28. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38
768 (Invitrogen Life TechnologiesTM)
- 769 29. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco BRL[®])
- 770 30. Eosina (Nuclear[®])
- 771 31. Fenol (C₆H₅OH) P.M. 94,11 (Invitrogen Life TechnologiesTM)
- 772 32. Formaldeído P.A. (Vetec[®])
- 773 33. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth[®])
- 774 34. Fosfato de sódio dihidratado (Na₂HPO₄ . 2H₂O) P.M 177,99 (Merck[®])
- 775 35. Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ . 2H₂O) P.M. 155,99 (Reagen[®])
- 776 36. Glicose (C₆H₁₂O₆) P.M. 180,16 (Reagen[®])
- 777 37. Hematoxilina (Nuclear[®])
- 778 38. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
- 779 39. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
- 780 40. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
- 781 41. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
- 782 42. Oligonucleotídeo iniciador (*primer e probe*)
- 783 - *forward* SVV-2682FW (*forward*; 5'- TTCCACTCCACCGACAACG -3'; *nucleotide*
784 (nt) 2682-2700) Leme *et al.* (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
- 785 - *reverse* SVV-3224RV (*reverse*; 5'- GATACCTTCCCACCCTTGC -3'; *nucleotide*
786 (nt) 3206-3224) Leme *et al.* (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
- 787 - *forward* SVV-q2688Fw (*forward*; 5'- CACCGACAACGCCGAGAC -3'; *nucleotide*
788 (nt) 2688-2706) Dall Agnol *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
- 789 - *reverse* SVV-q2782Rv (*reverse*; 5'- GAGATCGATCAAACAGGAACCTTGAC -3';
790 *nucleotide* (nt) 2757-2782) Dall Agnol *et al.* (2017) - 200 pmol (Invitrogen Life
791 Technologies[®])
- 792 - *probe* SVV-q2728Pb; (5'-FAM-ACTGACACCGATTTC- MGB-3'; *nucleotide* (nt)
793 2728-2743) Dall Agnol *et al.* (2017) - 100 pmol (Applied BiosystemsTM)
- 794 43. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life
795 TechnologiesTM)

- 796 44. *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units* (Invitrogen Life Technologies™)
797 45. Proteinase K (10mM Tris; 1mM *ethylenediamine tetra-acetic acid* [EDTA]; 0.5% Nonidet
798 P40; 1% *sodium dodecyl sulfate* [SDS]; 0.2mg/mL proteinase K) (Invitrogen Life
799 Technologies™)
- 800 46. *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen Life
801 Technologies™)
- 802 47. *RT-buffer (5x)* (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life
803 Technologies™)
- 804 48. Soro fetal bovino (Gibco BRL®)
- 805 49. *SuperScript™ III Reverse Transcriptase 200 units* (Invitrogen Life Technologies™)
- 806 50. *SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System 100 reactions*
807 (Invitrogen Life Technologies®)
- 808 51. *QuantIT™ dsDNA BR assay kit* (Invitrogen Life Technologies™)
- 809 52. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen®)
- 810 53. *TOPO® TA Cloning® Kits for Sequencing* (Invitrogen Life Technologies®)
- 811 54. *TripLE™ Express Stable Trypsin-like Enzyme* (Gibco®)
- 812 55. Tris (Nuclear®)
- 813 56. Triton x-100 (Synth®)
- 814 57. Xileno P.A. (Nuclear®)
- 815 58. Vermelho de fenol (C₁₉H₁₄O₅S) P.M. 354,38 (Reagen®)
- 816

5.2 Soluções e Tampões

817

818

819

Soluções e Tampões

820

- **Diluição dos primers**

822

PCR convencional para detecção da região VP1 de genoma do *Senecavirus A*

824

- *Primer forward SVV-2682FW*

Sequência: 5´- TTCCACTCCACCGACAACG -3´

Posição: 2682-2700

Concentração: 41,1 nmoles

Data de fabricação: Fev/2015

830

$41,1 \times 1000 = 41100$ pmoles

$41100 / 200 = 205,5$

833

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 205,5 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

837

- *Primer reverse SVV-3224RV*

Sequência: 5´- GATACCTTCCCACCCTTGC -3´

Posição: 3206-3224

Concentração: 30,7 nmoles

Data de fabricação: Fev/2015

843

$30,7 \times 1000 = 30700$ pmoles

$30700 / 200 = 153,5$

846

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 153,5 μL de água ultrapura autoclavada para obtenção de solução 10x

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

849

850 qRT-PCR para detecção da região VP1 do genoma de *Senecavirus A*
851
852 - *Primer forward SVV-q2688Fw*
853 Sequência: 5'- CACCGACAACGCCGAGAC -3'
854 Posição: 2688-2706
855 Concentração: 46,7 nmoles
856 Data de fabricação: Jan/2016
857
858 $46,7 \times 1000 = 46700$ pmoles
859 $46700 / 200 = 233,5$
860
861 *Primer mãe* (200 pmol/ μ L): ressuspender em 233,5 μ L de água ultrapura autoclavada para
862 obtenção de solução 10x
863 *Primer uso 1x* (20 pmol/ μ L): diluir o *primer mãe* (1:10) em água ultrapura autoclavada
864
865 - *Primer reverse SVV-q2782Rv*
866 Sequência: 5'- GAGATCGATCAAACAGGAACTTGAC -3'
867 Posição: 2757-2782
868 Concentração: 46,7 nmoles
869 Data de fabricação: Jan/2016
870
871 $46,7 \times 1000 = 46700$ pmoles
872 $46700 / 200 = 233,5$
873
874 *Primer mãe* (200 pmol/ μ L): ressuspender em 233,5 μ L de água ultrapura autoclavada para
875 obtenção de solução 10x
876 *Primer uso 1x* (20 pmol/ μ L): diluir o *primer mãe* (1:10) em água ultrapura autoclavada
877
878 - *Probe SVV-q2728Pb*
879 Sequência: 5'- FAM-ACTGACACCGATTTC-MGB -3'
880 Posição: 2728-2743
881 Concentração: 6000 pmoles/60 μ L
882 Data de fabricação: Dez/2015
883

884 *Probe* mãe (20 pmoles/ μ L): ressuspender 5 μ L em 20 μ L de água ultrapura autoclavada
885 para obtenção de solução 7x

886 *Probe* uso 1x (250 nM/ μ L): diluir a *probe* mãe (1:7) em água ultrapura autoclavada

887

888 • **Diluição de dNTP**

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

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

891

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

893 - 25 mL de fenol saturado em água

894 - 24 mL de clorofórmio

895 - 1 mL de álcool isoamílico

896

897 • **Gel de agarose 1%**

898 - 0,5 g de agarose

899 - 50 mL de tampão TBE 1x

900 - 20 μ L de brometo de etídio

901

902 • **Meio Luria Bertani (LB) sólido**

903 - 5 g de triptona

904 - 2,5 g de extrato de levedura

905 - 2,5 g de NaCl

906 - Dissolver em 400 mL de água destilada

907 - Completar para 500 mL (becker)

908 - 3,25 g de ágar em cada Erlenmeyer

909 - Adicionar 250 mL da solução a 3,25 g de ágar em cada Erlenmeyer que será autoclavado

910

911 • **Meio LB líquido**

912 - 5 g de triptona

913 - 2,5 g de extrato de levedura

914 - 2,5 g de NaCl

915 - Dissolver em 400 mL de água bidestilada e completar para 500 mL

916 - Aliquotar a solução em tubos de 3 mL e 5 mL e autoclavar

917

- 918 • **Hidratação da sílica**
- 919 - 6 g de sílica (SIGMA®)
- 920 - Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
- 921 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- 922 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- 923 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- 924 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- 925 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
- 926 - Ajustar o pH (pH 2,0)
- 927 - Aliquotar
- 928
- 929 • **SDS 10%**
- 930 - 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
- 931 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL
- 932
- 933 • **Solução L6**
- 934 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 935 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 936 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 937 - 2,6 g de Triton 100x
- 938
- 939 • **Solução L2**
- 940 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 941 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 942
- 943 • **Solução Salina de Saint Groth**
- 944 - 8 g de cloreto de sódio (NaCl)
- 945 - 0,4 g de cloreto de potássio (KCl)
- 946 - 1,77 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)
- 947 - 0,69 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄)
- 948 - 2 g Glicose
- 949 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1 L
- 950 - pH 7,2

951 • **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

952 - Azul de bromofenol 0,25%

953 - Sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%

954 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL

955

956 • **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**

957 - Tris 0,89 M

958 - Ácido bórico 0,89 M

959 - EDTA 0,02 M

960 - Água bidestilada q.s.p. 1 litro

961 - Ajustar o pH (pH 8,4)

962

963 • **Tampão Fosfato Salina – PBS**

964 - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)

965 - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)

966 - 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)

967 - 15 mM Potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4)

968 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL

969

5.3 Protocolo de Técnicas

970

971

972

Protocolos de Técnicas

973

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

976 1. *Suspensão fecal – extração bruta*

977 - 100 µL ou 100 mg de fezes

978 - 500 µL de PBS

979 - Homogeneizar em vórtex

980 - Centrifugar a 5000 x g/3 min

981 - Utilizar 400 µL do sobrenadante para extração

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

983 - 1,5 g do fragmento de órgão

984 - Macerar

985 - 15 mL de PBS

986 - Homogeneizar em vórtex

987 - Centrifugar a 3000 x g/10 min

988 - Utilizar 250 µL do sobrenadante para extração

989 - 250 µL da suspensão do fragmento de órgão

990 - 10 µL de tampão de lise (Proteinase K)

991 - Homogeneizar em vórtex

992 - Incubar a 56 °C/30 min

993 - Utilizar todo o volume para a extração do ácido nucléico

994

995 3. *Extração do ácido nucleico*

996 Fase I – Fenol

997 - 400 µL da suspensão fecal ou 200 µL da suspensão de tecido

998 - Adicionar 40 µL de SDS 10% ou 20 µL de SDS 10 %

999 - Homogeneizar em vórtex

- 1000 - Banho-maria 56 °C/20 min
- 1001 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1002 - Adicionar 400 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- 1003 - Homogeneizar em vórtex
- 1004 - Banho-maria 56 °C/15 min
- 1005 - Homogeneizar manualmente por 15 s
- 1006 - Centrifugar 10.000 x g/10 min
- 1007 - Recolher o sobrenadante em outro microtubo

- 1008 Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- 1009 - Adicionar 500 µL da solução L6
- 1010 - Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- 1011 - Homogeneizar em vórtex
- 1012 - Agitar em temperatura ambiente /30 min
- 1013 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1014 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- 1015 - Adicionar 500 µL de solução L2
- 1016 - Homogeneizar em vórtex
- 1017 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1018 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- 1019 - Adicionar 500 µL de solução L2
- 1020 - Homogeneizar em vórtex
- 1021 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1022 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- 1023 - Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- 1024 - Homogeneizar em vórtex
- 1025 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1026 - Desprezar sobrenadante em descarte comum
- 1027 - Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- 1028 - Homogeneizar em vórtex
- 1029 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1030 - Desprezar sobrenadante em descarte comum
- 1031 - Adicionar 1 mL de acetona P.A. gelada
- 1032 - Homogeneizar em vórtex

- 1033 - Centrifugar 10.000 x g/30 s
- 1034 - Desprezar sobrenadante
- 1035 - Secar o pellet em termo bloco a 60 °C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56 °C (15
- 1036 min)
- 1037 - Adicionar 50 µL de água DEPC
- 1038 - Homogeneizar em vórtex
- 1039 - Banho-maria 56 °C/15 min
- 1040 - Homogeneizar em vórtex
- 1041 - Centrifugar 13.000 x g/4 min
- 1042 - Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- 1043 - Estocar à -20 °C até a utilização
- 1044 • **Transcrição reversa (RT)**
- 1045 - Mix de Desnaturação e RT para detecção parcial da região da VP3/VP1 (*primer* RT-PCR
- 1046 convencional) e VP1 (*primer* qRT-PCR) do genoma de *Senecavirus A*

Desnaturação (65 °C/5 min)	
Reagentes	Volume (µL)
<i>Primer</i> SVV-3224RV/SVV-q2782Rv (20 pmol)	2
dNTP (2,5 mM)	1
Água ultrapura	6
RNA	5
Volume final	14

1047

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

- 1048 • **Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional: 542/118 pb**
 1049 - Mix de PCR convencional para detecção parcial da região da VP3/VP1 do genoma de
 1050 *Senecavirus A*

Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinum</i> [®] Taq DNA Polymerase (5U/µL)	0,5
<i>Primer</i> SVV-2682FW/ SVV-q2688Fw (20 pmol)	1
<i>Primer</i> SVV-3224RV/ SVV-q2782Rv (20 pmol)	1
Água ultrapura	36
cDNA	4
Volume final	50

- 1051
 1052 - Ciclos de tempo e temperatura da PCR convencional

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

1053 • **Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (qRT-PCR): 118 pb**

1055 - Mix de qRT-PCR para detecção parcial da região da VP1 do genoma do *Senecavirus A*

Reagentes	Volume (µL)
2X Reaction Mix	12,5
Rox™ Reference Dye (25 µM)	0,1
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	0,5
Primer SVV-q2688Fw (5 pmol)	2
Primer SVV-q2782Rv (5 pmol)	2
Probe SVV-q2728Pb (250 nM)	2,5
Água ultrapura	0,4
RNA	5
Volume final	25

1056

1057 - Ciclos de tempo e temperatura da qRT-PCR

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

1058

1059

1060 • **Eletroforese em gel de agarose a 2%**

1061 - 1,0 g de agarose

1062 - 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4

1063 - 20 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

1064 São utilizados 5 µL do *amplicon* e 1 µL do tampão de amostra. Corrida eletroforética sob

1065 voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes por aproximadamente 50 min.

1066 • Purificação de produto de PCR excisado do gel

- 1067 1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
- 1068 2. Adicionar 3 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.
- 1069 3. Incubar o tubo a 50 °C/15 min, homogeneizando a cada 3 min.
- 1070 4. Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com
- 1071 coluna.
- 1072 5. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1073 6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- 1074 7. Adicionar 500 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
- 1075 8. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1076 9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- 1077 10. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
- 1078 11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
- 1079 12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
- 1080 13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- 1081 14. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1082 15. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

1083

1084 • Purificação direta de produto de PCR

- 1085 1. Adicionar 4 volumes do *Binding buffer* (B2) a 1 volume de reação de PCR.
- 1086 2. Transferir a solução para uma coluna de purificação.
- 1087 3. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1088 4. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- 1089 5. Adicionar 650 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
- 1090 6. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1091 7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- 1092 8. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
- 1093 9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
- 1094 10. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
- 1095 11. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- 1096 12. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
- 1097 13. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

1098 • **Quantificação de produto de PCR**

1099 (Certificar-se de que todos os reagentes estão em temperatura ambiente)

1100 1. Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer*
1101 Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e
1102 100.

1103 2. Homogeneizar em vórtex.

1104 3. No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em
1105 2 µL do fragmento de DNA purificado.

1106 4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em
1107 10 µL do padrão 0.

1108 5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution*
1109 em 10 µL do padrão 100.

1110 6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s.

1111 7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min.

1112 8. Realizar a leitura usando *Qubit™ fluorometer* (Invitrogen™ Life Technologies, EUA).

1113 9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

1114 • **Sequenciamento pelo método Sanger**

1115 Preparo de amostras para o sequenciamento

1116

1117 As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na tabela abaixo:

1118

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/µL ou µg/mL)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/µL ou µM)
< 300	2	5
300 – 700	4	5
>700	10	10

1119 Mix do sequenciamento

1120

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

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

1121

1122 O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 µL de amostra purificada + 1 µL
1123 de *primer*.

1124 Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

1125

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

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

1126

1127 Precipitação com EDTA e Etanol

1128 - Adicionar 10 µL da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa *MicroAmp®*
1129 *Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (Applied Biosystems).

1130 - Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.

1131 - Adicionar 30 µL de etanol 100%.

1132 - Homogeneizar lentamente a placa.

1133 - Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.

1134 - Centrifugar a 2720 x g durante 30 min a 20 °C.

1135 - Desprezar o conteúdo da placa.

1136 - Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.

- 1137 - Adicionar 100 μ L de etanol 70%.
- 1138 - Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C.
- 1139 - Desprezar o conteúdo da placa.
- 1140 - Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- 1141 - Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- 1142 - Adicionar 10 μ L de formamida (HIDI).
- 1143 - Adicionar a septa.
- 1144 - Homogeneizar a placa em vórtex.
- 1145 - Submeter à placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- 1146 - Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- 1147 - Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- 1148 - Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

1150

1151 • **Clonagem do produto da qRT-PCR**

1152

1153 Pré-inoculação de *E.coli One Shot*[®] (Invitrogen Life Technologies[®])

1154

- 1155 1. Em um tubo de 3 mL de meio LB líquido autoclavado acrescentar 15 μ L de células de *E.*
- 1156 *coli*.
- 1157 2. Homogeneizar lentamente o tubo com LB.
- 1158 3. Incubar em *Shaker* à 37°C e 180 rpm, *overnight*.

1159

1160 Ligação do produto da PCR ao vetor

- 1161 1. Em um microtubo (0,5 mL) adicionar o DNA purificado a ser clonado: 0,5 a 4 μ L.
- 1162 2. Adicionar 1 μ L da solução de 1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl₂.
- 1163 3. Adicionar 1 μ L *pCRTM4-TOPO[®] TA vector*.
- 1164 4. Adicionar H₂O autoclavada q.s.p 6 μ L.
- 1165 5. Homogeneizar a reação delicadamente e incubar por 1 h, em temperatura ambiente e
- 1166 protegida da luz. Após a incubação, manter a reação em gelo até proceder à transformação.

1167 Preparação de células competentes

1168

- 1169 1. Diluir 150 μ L da pré-cultura em 5 mL de meio LB líquido e incubar à 37°C, 180 rpm, até
- 1170 DO 600 nm = 0,4 - 0,6 (aproximadamente 1 h).
- 1171 2. Logo após, deixar o tubo em banho de gelo por 5 min.
- 1172 3. Centrifugar 3 mL da cultura em dois microtubos (1,5 mL em cada tubo), a 5000 rpm/5 min.
- 1173 Obs: Manter as células e soluções em banho de gelo.
- 1174 4. Eliminar o sobrenadante por inversão do tubo e adicionar ao precipitado 500 μ L de 50 mM
- 1175 CaCl₂.
- 1176 5. Homogeneizar.
- 1177 6. Transferir o conteúdo dos dois tubos para outro tubo.
- 1178 7. Manter em banho de gelo por 10 min.
- 1179 8. Centrifugar a 5000 rpm/5 min e eliminar o sobrenadante posteriormente.
- 1180 9. Ressuspender as células em 300 μ L de 50 mM CaCl₂.
- 1181 10. Manter em banho de gelo por 20 min.
- 1182 11. Aliquotar 50 μ L de células competentes em microtubos e estocar a -20°C.

1183

1184 Transformação

1185

- 1186 1. Adicionar 3 μ L do produto da ligação a 50 μ L de células competentes e colocar em banho
- 1187 de gelo por 20 min.
- 1188 2. Incubar a mistura por 2 min a 42°C em banho-maria.
- 1189 3. Transferir imediatamente para banho de gelo por 5 min.
- 1190 4. Adicionar 1 mL de LB líquido e incubar por 1 h a 37°C sob agitação (180 rpm).
- 1191 5. Centrifugar a 5.000 rpm/10 min.
- 1192 6. Descartar o sobrenadante.
- 1193 7. Ressuspender o sedimento em 100 μ L de LB líquido.
- 1194 8. Semear em duas placas com LB sólido, contendo 75 μ g/mL de ampicilina, com o auxílio da
- 1195 alça de *Drigalsk*.
- 1196 9. Incubar em estufa a 37°C por 24 - 48 h.

1197

1198 Extração do plasmídeo

1199

- 1200 1. Em um tubo contendo 5 mL de meio LB líquido adicionar ampicilina (100 μ g/mL).

- 1201 2. Com o auxílio de uma haste esterilizada adicionar uma colônia de bactérias características
1202 no tubo.
- 1203 3. Incubar sob agitação (180 rpm) a 37°C/24 h.
- 1204 4. Transferir 1,5 mL da cultura em um microtubo e centrifugar a 5.000 x g/12 min. Descartar
1205 o sobrenadante. Repetir o procedimento.
- 1206 5. Adicionar 250 µL de *Resuspension buffer* (R3) com RNase A ao sedimento de células.
1207 Homogeneizar para ressuspender as células.
- 1208 6. Adicionar 250 µL de *Lysis buffer* (L7) para lisar as células e inverter o microtubo
1209 gentilmente por cinco vezes. Incubar em temperatura ambiente por 5 min.
- 1210 7. Adicionar 350 µL de *Precipitation buffer* (N4) para precipitar e inverter gentilmente cinco
1211 vezes ou até ficar homogêneo. Centrifugar o lisado a 12.000 x g/10 min.
- 1212 8. Transferir o sobrenadante para um tubo coletor de 2 mL com coluna e centrifugar a 12.000
1213 x g/1 min. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo e repetir a centrifugação.
- 1214 9. Adicionar 700 µL de *Wash Buffer* (W9 - tampão de lavagem com etanol) no centro da
1215 coluna.
- 1216 10. Centrifugar a 12.000 x g/1 min, descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo e
1217 repetir a centrifugação.
- 1218 11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
- 1219 12. Adicionar 75 µL de *TE Buffer* (TE) no centro da coluna. Incubar a temperatura ambiente
1220 por 1 min.
- 1221 13. Centrifugar a 12.000 x g/2 min.
- 1222 14. Estocar o plasmídeo de DNA purificado a -20°C.
- 1223
- 1224 • **Isolamento do *Senecavirus A***
- 1225 1. Células
- 1226 - Preparar células PK-15 em garrafas (25 mL) 24 h antes da inoculação do material (inóculo).
1227 - Preparar garrafas extras para utilizar como controles.
- 1228 2. Preparo do material a ser inoculado (inóculo).
- 1229 Líquido de vesícula
- 1230 - 100 µL de líquido de vesícula.
- 1231 - 500 µL de meio DMEM (sem SFB).
- 1232 - Homogeneizar em vórtex.
- 1233 - Centrifugar a 1000 rpm (baixa rotação)/5 min.

- 1234 - 500 µL do sobrenadante + 500 µL de DMEM (sem SFB) + 50 µL de Anti-Anti 100X
1235 (antibiótico e antifúngico - Gibco®).
1236 - Utilizar 1 mL para inoculação.
- 1237 3. Adsorção
1238 - 1 mL do material previamente preparado (líquido de vesícula ou tecido).
1239 - Remover o meio das garrafas com células.
1240 - Lavar garrafa 3X com solução salina de Saint Groth.
1241 - Adicionar 1 mL do inóculo em garrafa contendo monocamada de cultivo de célula PK-15
1242 mantida sob condição estacionária.
1243 - Incubar em agitação em estufa a 37°C/3 h a 5% de CO₂ controlado.
1244 - Lavar garrafa 3X com solução salina de Saint Groth.
1245 - Adicionar 10 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 3X de Anti-Anti (Gibco®).
1246 - Incubar em estufa a 5% de CO₂ e monitorar diariamente para a presença de efeito citopático
1247 (ECP).
1248 - Caso não ocorra ECP, incubar por até 7 dias, congelar a -80°C, descongelar e fazer novas
1249 passagens.
1250 - Para fazer adicionais (passagens cegas), caso não tenha ocorrido ECP, as garrafas devem ser
1251 congeladas a -80°C, descongeladas a 37°C e utilizar 1 mL do sobrenadante para inocular
1252 outras garrafas com cultivos celulares de PK-15 por 24 h.
- 1253 • **Imuno-histoquímica**
- 1254 - Xilol I – 20 min.
1255 - Xilol II – 20 min.
1256 - Álcool absoluto I – 10 min.
1257 - Álcool absoluto II – 10 min.
1258 - Álcool 90% – 5 min.
1259 - Álcool 80% – 5 min.
1260 - Álcool 70% – 5 min.
1261 - Lavar em água corrente por 10 min.
1262 - Enxaguar duas vezes em água destilada.

1263 Recuperação Antigênica

- 1264 - Para SVV-60: Colocar as lâminas em recipiente plástico com solução tampão citrato pH 6,0
1265 em micro-ondas (750W) por 9 min. Deixar esfriar em temperatura controlada (25°C), na
1266 solução tampão citrato pH 6,0 por 30 min.
- 1267 - Lavar em água corrente por 10 min.
- 1268 - Enxaguar duas vezes em água destilada.
- 1269 - Colocar as lâminas em solução de metanol (140 mL) + água oxigenada 20 volumes (10 mL).
- 1270 - Deixar em cuba de vidro em câmara escura por 20 min.
- 1271 - Lavar em água corrente por 10 min.
- 1272 - Enxaguar duas vezes em água destilada.
- 1273 - Secar as lâminas individualmente com papel absorvente e colocar o anticorpo primário
1274 (SVV-60) cobrindo todo o corte.
- 1275 - Incubar em câmara úmida, deixando em geladeira por 18 h.
- 1276 - Lavar as lâminas com solução PBS pH 7,2 por 5 min (repetir duas vezes).
- 1277 - Secar as lâminas individualmente e colocar uma gota do anticorpo secundário, cobrindo todo
1278 o corte. Incubar a 25°C por 20 min.
- 1279 - Lavar as lâminas com solução de PBS pH 7,2 por 5 min (repetir duas vezes).
- 1280 - Cobrir o corte com o DAB e observar revelação (3 a 4 min).
- 1281 - Lavar as lâminas em água corrente por 10 min.
- 1282 - Enxaguar duas vezes com água destilada.
- 1283 - Contra-corar com hematoxilina (3 min).
- 1284 - Lavar em água corrente por 10 min.
- 1285 - Enxaguar em água destilada duas vezes.
- 1286 - Álcool 70% – 5 min.
- 1287 - Álcool 80% – 5 min.
- 1288 - Álcool 90% – 5 min.
- 1289 - Álcool absoluto I – 10 min.
- 1290 - Álcool absoluto II – 10 min.
- 1291 - Xilol I – 20 min.
- 1292 - Xilol II – 20 min.
- 1293 - Montar as lâminas.

- 1294 • **Hematoxilina-eosina (HE)**
- 1295 - Xilol I – 20 min.
- 1296 - Xilol II – 20 min.
- 1297 - Álcool absoluto I – 2 min.
- 1298 - Álcool absoluto II – 2 min.
- 1299 - Álcool 95% I – 2 min.
- 1300 - Álcool 95% II – 2 min.
- 1301 - Lavar em água destilada – 2 min.
- 1302 - Corar com hematoxilina (10 min).
- 1303 - Lavar em água corrente por 10 min, desprezar a primeira água em recipiente apropriado.
- 1304 - Álcool 95% – 1 min.
- 1305 - Eosina – 1 min.
- 1306 - Álcool 95% – 1 min.
- 1307 - Álcool absoluto I – 2 min.
- 1308 - Álcool absoluto II – 2 min.
- 1309 - Xilol I – 2 min.
- 1310 - Xilol II – 2 min.
- 1311 - Montar as lâminas.
- 1312

5.4 Lista de Softwares

1313

1314

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

Lista de Softwares

- *Primer Express Software*
- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- *BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)