



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÉSAR FERONATO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE
NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DO
SENECAVIRUS A EM LEITÕES COM SÍNDROME
MULTISSISTÊMICA NEONATAL**

Londrina
2016

CÉSAR FERONATO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE
NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DO
SENECAVIRUS A EM LEITÕES COM SÍNDROME
MULTISSISTÊMICA NEONATAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Londrina
2016

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

Feronato, César Feronato.

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DO SENECAVIRUS A EM LEITÕES COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA NEONATAL / César Feronato Feronato. - Londrina, 2016.
70 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal , 2016.
Inclui bibliografia.

1. Seneca Valley virus. - Tese. 2. Diagnóstico molecular - Tese. 3. Infecção por picornavírus. - Tese. 4. Doença vesicular. - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal . III. Título.

CÉSAR FERONATO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE *NESTED*-
PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DO *SENECAVIRUS A* EM
LEITÕES COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA NEONATAL**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de Junho de 2016.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e Laboratório Multiusuário de 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 mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

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

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

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

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

4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida mãe,
Maria Aparecida Feronato (*in memórian*),
Pelo incentivo e perseverança da minha
formação acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque é a luz, fortaleza, proteção e fonte de sabedoria.

Ao meu orientador, Professor Dr. Amauri Alcindo Alfieri, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação proporcionaram-me a oportunidade de alcançar maiores conhecimentos e a olhar para o universo científico de maneira mais profissionalizada. Muito obrigado!

Aos professores que constituíram a banca de qualificação, Dr Selwin Arlington Headley e Dr^a Elis Lorenzetti e de defesa, Dr^a Roberta Lemos Freire e Dr^a Michele Lunardi.

A professora e doutoranda Raquel Arruda, pelas horas destinadas em prol da pesquisa voltada ao SenV-A e por sua dedicação e paciência em me auxiliar nas revisões e preparação das provas laboratoriais.

A Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica e científica.

Aos amigos, colegas e funcionários do laboratório de virologia, pela convivência e contribuições.

Aos meus pais e familiares, que sempre me incentivaram e fariam qualquer coisa para me impulsionar na busca de maiores conquistas.

A minha esposa Elisangela, incentivadora maior, por toda sua generosidade, inspiração e companheirismo e as minhas queridas filhas Barbara e Bianca, pela paciência e curiosidade em saber o que eu estava fazendo.

A empresa MSD Saúde Animal, por permitir e incentivar seus colaboradores na busca de maiores conhecimentos.

Especial agradecimento a unidade de negócios de Suinocultura e ao colega e gestor pelo Rui Nobrega pelo grande incentivo inicial desta jornada. Valeu SBU TEAM

“Algo só é impossível até que alguém duvide
e resolva provar o contrário.”

Albert Einstein

RESUMO

FERONATO, César. **Desenvolvimento e avaliação da técnica de *nested*-PCR para a detecção do RNA do *Senecavirus A* em leitões com síndrome multissistêmica neonatal.** 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

O *Senecavirus A* (SenV-A) foi descrito pela primeira vez em 2002, nos Estados Unidos. O vírus pertence à família *Picornaviridae*, gênero *Senecavirus*. Inicialmente, o SenV-A não foi associada a uma patologia específica; entretanto desde 2008 existem relatos da possível associação desse vírus com quadros clínicos de doença vesicular em suínos. Em 2015, o SenV-A foi associado a casos de doença vesicular em suínos nas fases de creche e terminação e a sinais clínicos de letargia, hiperemia cutânea, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita em leitões de granjas suinícolas brasileiras e estadunidenses. Desde então, a infecção pelo SenV-A é considerada uma doença infecciosa emergente que tem sido associada com doença vesicular em suínos desmamados (creche) e adultos (terminação) e com uma síndrome multissistêmica em leitões de diferentes países, como os Estados Unidos, Brasil e China. Entre os sistemas diagnósticos disponíveis para a investigação da infecção pelo SenV-A, as técnicas moleculares são as mais utilizadas. Entretanto, muitas destas técnicas são de alto custo e exigem conhecimento técnico avançado para a sua execução e/ou interpretação. O objetivo deste estudo foi estabelecer a técnica de *nested*-PCR para o diagnóstico de rotina para a infecção pelo SenV-A em leitões. Amostras de tecidos ($n=177$) foram coletadas de 37 leitões provenientes de 18 granjas localizadas em quatro diferentes estados de três regiões geográficas distintas do Brasil. A técnica de RT-PCR foi realizada para amplificar um produto de 542 pb das regiões VP3/VP1 do genoma do SenV-A. Para a *nested*-PCR, um par de *primers* foi selecionado para amplificar um fragmento interno da VP1 com 316 pb. Quinze (40,5%) e 23 (62,2%) dos 37 leitões avaliados foram positivos para o SenV-A pelas técnicas de RT-PCR e *nested*-PCR, respectivamente. O RNA do SenV-A foi detectado em 61 (34,5%) das 177 amostras de tecidos pela RT-PCR, enquanto a *nested*-PCR revelou que 84 (47,5%) das 177 amostras foram positivas para o vírus ($p<0,05$). Considerando os resultados de acordo com as granjas, 11 (61,1%) e 16 (88,9%) das 18 granjas foram positivas para o SenV-A na RT-PCR e na *nested*-PCR, respectivamente. A análise de sequenciamento de nucleotídeos revelou similaridade de 98,7% a 100% entre as sequências de SenV-A brasileiras e de 86,6% a 98% com cepas de SenV-A de outros países, confirmando a especificidade dos amplicons. A técnica de *nested*-PCR deste estudo foi capaz de amplificar o RNA do SenV-A em amostras biológicas, leitões e granjas que foram consideradas negativas pela RT-PCR e é proposta para a investigação de rotina da infecção pelo SenV-A, especialmente quando outras técnicas não estão disponíveis ou quando um grande número de amostras devem ser examinadas para a presença viral.

Palavras-chave: *Seneca Valley virus*. Diagnóstico. Detecção molecular. Infecção por picornavírus. Doença vesicular.

ABSTRACT

FERONATO, César. **Development and evaluation of a nested-PCR assay for the detection of *Senecavirus A* RNA in piglets with neonatal multisystemic syndrome.** 2016. 70 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

Senecavirus A (SenV-A) was first described in 2002 in the United States. The virus belongs to the *Picornaviridae* family, genus *Senecavirus*. Originally, the SenV-A was not associated with a specific pathology; however since 2008 there are reports of the likely association of this virus with clinical signs of vesicular disease in pigs. In 2015, the SenV-A was associated with cases of vesicular disease in pigs at nursery and finisher ages and with clinical manifestations of lethargy, cutaneous hyperemia, diarrhea, neurological signs, and/or sudden death in neonatal piglets of Brazilian and North American pig herds. Since then, the SenV-A infection is considered an emerging disease that has been associated with vesicular disease in weaned and adult pigs and with a multisystemic syndrome in neonatal piglets of different countries, such as the United States, Brazil, and China. Among the diagnostic systems available for the SenV- A infection investigation, the molecular techniques are more frequently used. However, many of these techniques are expensive and require highly skilled expertise for their execution and/or interpretation. This study aimed to establish a nested-PCR assay for the routine diagnosis of SenV-A infection in piglets. Tissue samples ($n=177$) were collected from 37 piglets of 18 pig farms located in four different Brazilian states of three distinct geographical regions. The RT-PCR assay was performed to amplify a 542 bp product size of VP3/VP1 regions of SenV-A genome. For the nested-PCR, a primer set was defined to amplify an internal VP1 fragment of 316 bp. Fifteen (40.5%) and 23 (62.2%) of the 37 piglets were positive for the SenV-A in the RT-PCR and nested-PCR assays, respectively. The SenV-A RNA was detected in 61 (34.5%) of the 177 samples with the RT-PCR, while the nested-PCR assay showed that 84 (47.5%) of the 177 samples were with the virus ($p<0.05$). Considering the results according to the herds, 11 (61.1%) and 16 (88.9%) of the 18 pig herds were positive for the SenV-A in the RT- PCR and nested-PCR assays, respectively. Nucleotide sequencing analysis revealed similarities of 98.7% to 100% among SenV-A Brazilian strains and of 86.6% to 98% with SenV-A strains from other countries, confirming the specificity of the amplicons. The nested-PCR assay in this study was suitable to amplify the SenV-A RNA in biological specimens, piglets, and/or herds that were considered as negative in the RT- PCR assay, and is proposed for the routine investigation of the SenV-A infection, especially when other techniques are not available or when a great number of samples has to be examined for the virus presence.

Keywords: *Seneca Valley virus*. Diagnostic. Molecular detection. Picornavirus infection. Vesicular disease.

LISTA DE FIGURAS

1 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Mercado mundial de carne suína – principais produtores, importadores e exportadores de carne suína em 2014..... 17

Figura 2 – Representação estrutural da partícula de *Senecavirus A*..... 19

Figura 3 – Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*. A poliproteína precursora é flanqueada pela região 5’UTR, no qual a proteína ligada ao genoma (*genome-linked protein*, VPg) e o sítio interno de entrada ao ribossomo (*internal ribosome entry site*, IRES) do tipo IV; a cauda poli(A) está representada na porção terminal da região 3’UTR. A proteína *Leader* (L) e as três outras principais proteínas P1, P2 e P3 são apresentadas, com a indicação das sequências codificantes do capsídeo e das proteínas não estruturais. Está representada cada uma das proteínas virais maduras após o processamento da poliproteína, com o padrão L-4-3-4 definido. A VPg codificada pela 3B está presente 20

2 DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A NESTED-PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF *SENECAVIRUS A* RNA IN PIGLETS WITH NEONATAL MULTISYSTEMIC SYNDROME.

Figure 1 – Primer positions within the VP1 nucleotide sequence for the (A) first round RT-PCR (LEME et al., 2015) and (B) nested-PCR assays. GenBank accession number of the reference sequence: NC_011349. 41

Figure 2 – Lesions from piglets. (A and B) Skin lesions on the hind limbs and hooves; (C) Diphtheric gingivitis; (D) diphtheric glossitis..... 43

Figure 3 – Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using the Kimura two-parameter model based on partial (315 bp) VP1 genomic region of the *Senecavirus A* strains in this study (black filled circle ●), of Brazil, and others available in GenBank. The accession numbers of representative sequences are indicated between parentheses. Bootstrap values were determined in 1,000 replications..... 46

LISTA DE TABELAS

1 DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A NESTED-PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF *SENECAVIRUS A* RNA IN PIGLETS WITH NEONATAL MULTISYSTEMIC SYNDROME.

Table 1– Number of herds, piglets, and samples submitted for the *Senecavirus A* diagnosis by nested-PCR assay according to the different states/regions of Brazil 39

Table 2– *Senecavirus A* detection by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR assays from the different tissues/organs of 37 piglets at first week of age 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|--|
| aa | <i>Amino acid</i> (Aminoácido) |
| APBA | Associação Brasileira de Proteína Animal DEPC – <i>Diethylpyrocarbonate</i> (Dietilpirocarbonato) |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico) |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático) |
| FMD | <i>Foot-and-mouth disease</i> (Febre aftosa) |
| FMDV | <i>Foot-and-mouth disease virus</i> (Vírus da Febre Aftosa) |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) |
| IRES | <i>Internal Ribosome Entry Site</i> (Sitio interno de entrada no ribossomo) |
| kb | Kilo bases |
| Nested-PCR | Reação Interna de PCR |
| nt | Nucleotídeo |
| NGS | <i>Next Generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova Geração) |
| NVSL | <i>National Veterinary Services Laboratories</i> (Laboratório Nacional de Serviços Veterinários) |
| OIE | <i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal) |
| ORF | <i>Open Reading frame</i> (Fase aberta de leitura) |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> (Fosfato Salina Tamponada) |
| PCV2 | <i>Porcine circovirus 2</i> (Circovírus Suíno tipo 2) |
| PEDV | <i>Porcine Epidemic Diarrhea Virus</i> (Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos) |
| PPV | <i>Porcine Parvovirus</i> (Parvovírus Suíno) |
| qPCR | <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação da polimerase em cadeia quantitativa) |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RT-PCR | <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa) |
| RVA | Rotavírus A |
| RVB | Rotavírus B |
| RVC | Rotavírus C |

| | |
|---------|---|
| RVH | Rotavírus H |
| SDCoV | <i>Swine Delta Coronavirus</i> (Deltacoronavírus Suíno) SenV-A – Senecavirus A |
| SVDV | <i>Swine vesicular disease vírus</i> (Vírus da Doença Vesicular Suína) |
| SVV | <i>Seneca Valley Virus</i> |
| TGEV | <i>Transmissible gastroenteritis vírus</i> (Vírus da Gastroenterite Transmissível) |
| USAHA - | <i>United States Animal Health Association</i> (Associação Americana de Saúde Animal) |
| UTR | <i>Untranslated region</i> (Região não traduzida) |
| VESV | <i>Vesicular exanthema of swine virus</i> (Vírus do Exantema Vesicular Suíno) |
| VSV | <i>Vesicular stomatitis vírus</i> (Vírus da Estomatite Vesicular) |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO | 16 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.2 INFECÇÃO VESICULAR EM SUÍNOS | 18 |
| 1.3 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO <i>SENECAVIRUS A</i> | 19 |
| 1.4 <i>SENECAVIRUS A</i> E DOENÇA VESICULAR SUÍNA | 21 |
| 1.5 <i>SENECAVIRUS A</i> NO BRASIL..... | 23 |
| 1.6 <i>SENECAVIRUS A</i> FORA DO CONTINENTE AMERICANO | 25 |
| 1.7 DIAGNÓSTICO | 26 |
| 1.8 CONCLUSÃO..... | 27 |
| 1.9 REFERÊNCIAS..... | 28 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| | |
| 3 ARTIGO CIENTÍFICO | |
| 3.1 DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A NESTED-PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF <i>SENECAVIRUS A</i> RNA IN PIGLETS WITH NEONATAL MULTISYSTEMIC SYNDROME | 34 |
| Abstract..... | 35 |
| Introduction | 36 |
| Materials and methods..... | 38 |
| Results | 43 |
| Discussion..... | 47 |
| References | 50 |
| | |
| 4 CONCLUSÕES | |
| CONCLUSÕES | 54 |
| | |
| 5 ANEXOS | 56 |

| | |
|--|----|
| 5.1 ANEXO A: LISTA DE REAGENTES..... | 57 |
| 5.2 ANEXO B: SOLUÇÕES E TAMPÕES | 59 |
| 5.3 ANEXO C: PROTOCOLOS DE TÉCNICAS | 63 |
| 5.4 ANEXO D: LISTA DE <i>SOFTWARES</i> | 70 |

1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

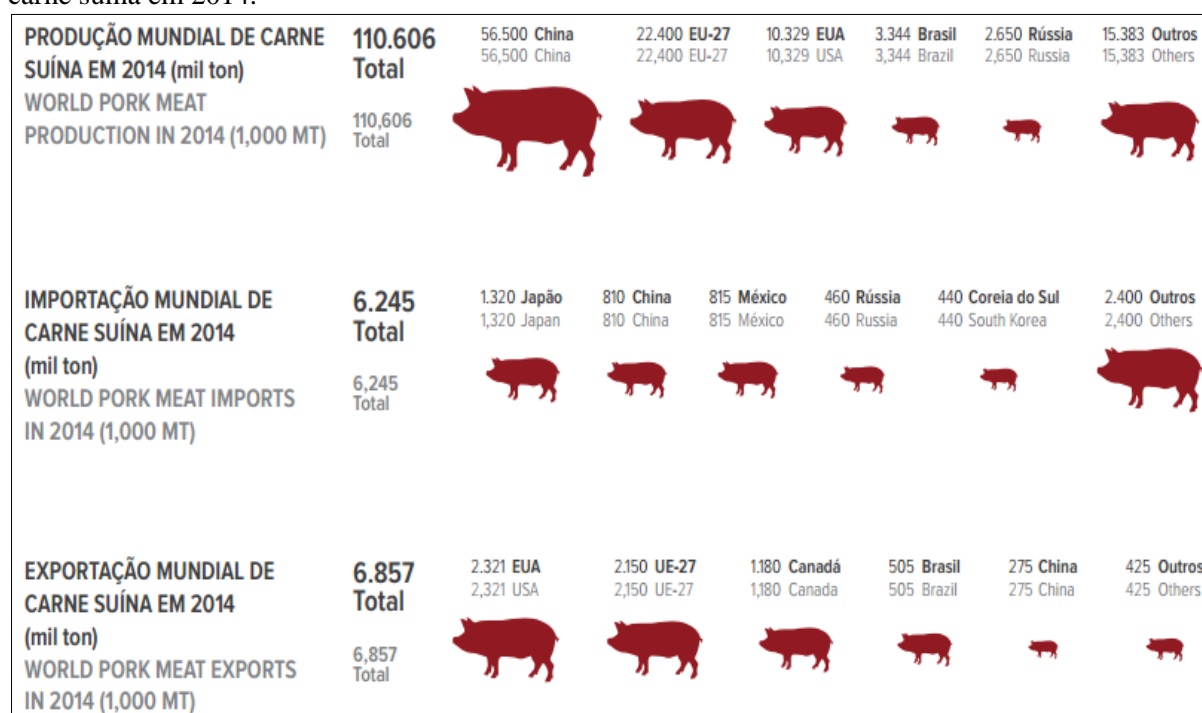
1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem posição de destaque no ranking de produção e exportação mundial de carne suína, ocupando o quarto lugar no cenário mundial. Este posicionamento faz-se com base em elementos como sanidade, nutrição, bom manejo das granjas, produção integrada e, principalmente, aprimoramentos gerenciais dos produtores (BRASIL, 2016).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA, em 2014 foram produzidas 3,34 milhões toneladas de carne suína, das quais 505 mil toneladas foram exportadas (Figura 1). Já o mercado interno apresenta-se em constante crescimento e pode ser considerado como um dos pilares de sustentação da suinocultura brasileira, superando expectativas em relação ao aumento do consumo per capita de carne suína. Em 2014, aproximadamente 86% da produção brasileira de carne suína foi destinada ao mercado interno (ABPA, 2015).

Figura 1 – Mercado mundial de carne suína – principais produtores, importadores e exportadores de carne suína em 2014.



Fonte: ABPA, 2015.

1.2 INFECÇÕES VESICULARES EM SUÍNOS

Algumas infecções virais em animais, em geral após um breve período de viremia, apresentam epiteliotropismo e caracterizam-se por promover a formação de vesículas que podem evoluir para úlceras em epitélio e mucosas (OIE, 2015).

As principais doenças vesiculares de suínos são a febre aftosa (Vírus da febre aftosa – FMDV, família *Picornaviridae*); a estomatite vesicular (Vírus da estomatite vesicular – VSV, família *Rhabdoviridae*); a doença vesicular suína (Vírus da doença vesicular suína – SVDV, família *Picornaviridae*) e o exantema vesicular suíno (Vírus do exantema vesicular suíno - VESV, família *Caliciviridae*). A febre aftosa é considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como a mais importante doença animal, particularmente em virtude de seu grande potencial de transmissibilidade, sendo a primeira doença para a qual a OIE elaborou uma lista de países/zonas livres com e sem vacinação. Desta maneira, todas as doenças listadas anteriormente e que evoluem com a formação de vesículas em epitélio e mucosas são de comunicação obrigatória e devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de febre aftosa (OIE, 2015).

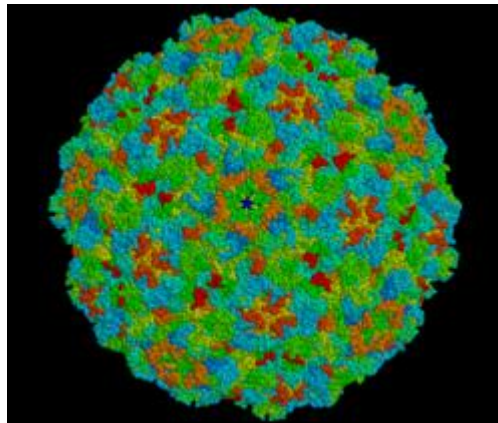
Outras infecções que ocasionam lesões epiteliais com características vesiculares podem ocorrer em animais de produção, porém com frequências de ocorrência, potencial patogênico, e de transmissibilidade muito inferiores, particularmente em comparação à febre aftosa. Este é o caso do parvovírus suíno (família *Parvoviridae*) e do *Enterovirus G* (família *Picornaviridae*) que, com frequência muito esporádica, já foram associados a lesões vesiculares cutâneas em suínos (KNOWLES, 1988, WHITAKER; NEU; PACE, 1990, LAGER; MENGELING, 1994). Desde 2008, outro vírus, denominado *Senecavirus A* (SenV-A), tem sido associado à doença vesicular em suínos (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008, SINGH et al., 2012, LEME et al., 2015).

1.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E CARACTERÍSTICAS DO *SENECAVIRUS A*

O SenV-A, anteriormente denominado *Seneca Valley virus* (SVV) foi isolado em Gaithersburg, cidade localizada no estado de Maryland, nos Estados Unidos da América (EUA), em 2002. Inicialmente, o vírus foi considerado apatogênico em suínos, bovinos, camundongos e seres humanos (KNOWLES et al., 2006). Recentemente, uma nova nomenclatura foi proposta para o SVV para estar em consonância com a nomenclatura definida para as outras espécies pertencentes a outros gêneros de picornavírus. Assim, o *Seneca Valley virus* passou a ser denominado *Senecavirus A* (ICTV, 2014).

O SenV-A pertence ao gênero *Senecavirus*, família *Picornaviridae*. Os membros dessa família são pequenos, com aproximadamente 30 nm de diâmetro, possuem capsídeo icosaédrico e não são envelopados (Figura 2). O genoma viral é composto por RNA de fita simples, linear e de polaridade positiva, cuja extensão pode variar entre 7 e 9 kb e que codifica uma única poliproteína (FLATHER; SEMLER, 2015).

Figura 2 – Representação estrutural da partícula de *Senecavirus A*.

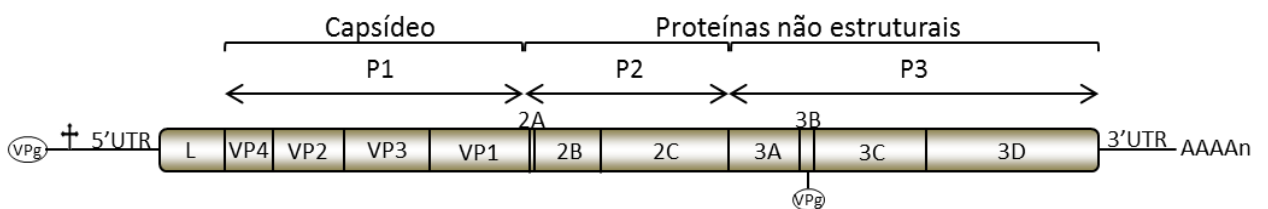


Fonte: <http://www.picornaviridae.com/structures/senecavirus.htm>

O genoma dos picornavírus possui o padrão L-4-3-4, ou seja, *Leader* – 4 polipeptídeos da P1 – 3 polipeptídeos da P2 – e 4 polipeptídeos da P3 (JIANG et al., 2014). A região 5' terminal da região traduzida do genoma dos picornavírus, também denominada P1, codifica as proteínas virais VP4, VP2, VP3 e VP1, que formam as unidades básicas estruturais do capsídeo (JIANG et al., 2014). A região P2 está localizada na região genômica intermediária

dos picornavírus e codifica proteínas não estruturais, denominadas 2A, 2B e 2C, que possuem atividade de protease (AO; SUN; GUO, 2014, FLATHER; SEMLER, 2015, PAUL; WIMMER, 2015). A região 3' terminal da região traduzida do genoma dos picornavírus, ou região P3, codifica proteínas não estruturais adicionais, denominadas 3A, 3B, 3C e 3D, provavelmente envolvidas na replicação viral (Figura 3) (GONZALEZ-MAGALDI et al., 2014, SUN; GUO; LOU, 2014, FERRER-ORTA; FERRERO; VERDAGUER, 2015).

Figura 3 – Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O SenV-A possui o genoma típico de outros picornavírus. O RNA genômico do vírus consiste de aproximadamente 7200 nt, além de 666 nt na porção 5'UTR e de 71 nt na 3'UTR, com cauda poli(A). O genoma viral possui uma única ORF que codifica uma poliproteína com cerca de 2180 aminoácidos (aa) (HALES et al., 2008). A análise da sequência dos nt 1-400 da 5'UTR do protótipo SVV-001 revelou altos níveis de estruturas secundárias, incluindo *stem-loop* (HALES et al., 2008). Estudos sugeriram que a região 5'UTR do genoma do SenV-A possua um sítio de entrada no ribossomo (*internal ribosome entry site* - IRES), cuja função é permitir a tradução do RNA viral de forma independente por meio da inibição da tradução do RNA celular. Comparando-se com os demais membros da família *Picornaviridae*, os enterovírus e rinovírus possuem IRES tipo I; os cardiovírus, aphotovírus, parechovírus, erbovírus e kobuvírus possuem IRES tipo II; o tipo III está presente nos hepatovírus e o tipo IV no SenV-A, teschovírus, sapelovírus, senecavírus, tremovírus, avihepatovírus, avisivírus e aquamavírus (FLATHER; SEMLER, 2015, MARTINEZ-SALAS et al., 2015). A análise da região 3'UTR do SVV-001 revelou duas estruturas *stem-loop* com potencial para formar uma

estrutura *kissing-loop* (HALES et al., 2008), considerada importante para a replicação dos enterovírus (MIRMOMENI; HUGHES; STANWAY, 1997).

1.4 *Senecavirus A* associado à doença vesicular em suínos

Desde 2002 foram realizados estudos enfocando as propriedades biológicas e sorológicas do SenV-A, bem como a sua epidemiologia em rebanhos suínos de diferentes estados norte-americanos. Com base nestes estudos, os suínos foram considerados hospedeiros naturais do SenV-A, ao qual não foi, inicialmente, estabelecida uma patologia específica (KNOWLES et al., 2006).

Amass et al. (2004) descreveu surtos de doença vesicular em suínos de maternidade, creche e terminação ocorridos no estado norte-americano de Indiana. Os animais apresentavam um ou mais sinais clínicos como letargia, febre e lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas em mucosas oral e gengival, língua, focinho, casco, principalmente na região da banda coronária, além de laminite. Naquela ocasião, os agentes virais responsáveis pelas infecções vesiculares clássicas como o FMDV, VSV, SVDV e VESV foram pesquisados e não foram encontradas evidências da ocorrência de alguma dessas viroses nos rebanhos acometidos. Outro vírus, atualmente denominado *Teschovirus A* e também pertencente à família *Picornaviridae*, foi detectado em amostras de alguns dos animais acometidos e também em tecidos de suínos saudáveis pertencentes ao mesmo rebanho. Por se tratar de um vírus ubíquo em populações de suínos de diferentes idades em todo o mundo, a presença do *Teschovirus A* não foi associada à ocorrência das doenças vesiculares e foi considerado apenas um achado acidental. Neste surto o agente etiológico causal das lesões vesiculares não foi identificado. Por ser de etiologia desconhecida, a doença passou a ser chamada de Doença Vesicular Idiopática Suína (AMASS et al., 2004).

Três anos após os surtos ocorridos no estado norte-americano de Indiana, Pasma; Davidson e Shaw (2008) relataram que suínos procedentes de sete granjas do Canadá e que estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares ou ulcerativas em focinho e ao longo da banda coronária, com separação dos tecidos do casco e descamação dos seus anexos. Cerca de 80% destes animais apresentavam claudicação e apenas alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de lesões vesiculares em suínos tais como o FMDV, VSV, SVDV e VESV resultaram negativos. Entretanto, por meio da técnica molecular da reação da polimerase em cadeia, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), o SenV-A foi detectado nos suínos acometidos, sendo considerado o provável agente causal da doença vesicular naquele lote de animais (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008).

Um caso isolado de doença vesicular suína ocorreu em um animal presente em uma exposição agropecuária do estado americano de Indiana em 2012 (SINGH et al., 2012). Raspados das lesões vesiculares e fluido orofaríngeo do animal de 6 meses de idade e com sinais clínicos foram negativos por RT-PCR para o FMDV, VSV, SVDV e VESV. Foram também realizados estudos sorológicos a partir de amostras deste animal utilizando diferentes metodologias, com resultados também negativos para os vírus classicamente envolvidos com a ocorrência de sinais clínicos vesiculares em suínos. A tentativa de isolamento viral a partir das amostras de raspados das lesões vesiculares e do fluido orofaríngeo não foi eficiente em isolar qualquer vírus. Entretanto, por meio da técnica de RT-PCR, foi possível identificar o SenV-A a partir das lesões vesiculares deste animal. Este foi o segundo estudo em que o SenV-A foi identificado em suínos com doença vesicular em que as outras doenças vesiculares clássicas haviam sido descartadas por testes específicos (SINGH et al., 2012).

Ao longo dos últimos 20 anos, por meio de estudos sorológicos retrospectivos, outras 12 cepas virais, sorologicamente semelhantes ao protótipo, denominado de SVV-001, foram isoladas no Laboratório Nacional de Serviços Veterinários (NVSL), em Ames, Iowa, EUA, a partir de suínos provenientes de diferentes estados norte-americanos, o que sugere que o SVV-001 e as outras cepas são comuns e estão amplamente distribuídas, tanto temporal quanto geograficamente, naquele país (HALES et al., 2008).

Em 2012, a *United States Animal Health Association* (USAHA) elaborou uma resolução na qual o SenV-A e a doença vesicular idiopática suína foram incluídos como importantes focos de estudo, particularmente devido aos sinais clínicos semelhantes com os da febre aftosa. A USAHA sugeriu ainda o desenvolvimento e implementação de planos para minimizar as consequências de lesões vesiculares não associadas às doenças exóticas de animais encontrados em suínos daquele país (USAHA, 2012), reforçando a importância sanitária e econômica deste patógeno como causador de uma potencial doença emergente em suínos.

1.5 *SENECAVIRUS A* NO BRASIL

No final de 2014 e início de 2015 surtos de doença vesicular em suínos nas fases de creche, terminação e em reprodutores foram relatados nos estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná e Santa Catarina (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015). No estudo realizado a partir de amostras provenientes de granjas suinícolas localizadas no estado do Paraná e Santa Catarina, o SenV-A foi identificado pela técnica de RT-PCR em líquido de vesículas de suínos adultos, em lesões vesiculares de língua e mucosa oral e em raspados cutâneos de lesões vesiculares de animais de 22 a 65 dias de idade (LEME et al., 2015). Por meio da técnica de RT-PCR os agentes virais vesiculares clássicos e outros picornavírus (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), previamente descritos como possíveis agentes causais de

lesões cutâneas em suínos e já identificados em rebanhos suínos brasileiros, foram também pesquisados, não tendo sido encontrados. No mesmo estudo, animais assintomáticos de granjas suínos com e sem relatos da doença foram amostrados e foram negativos para todos os agentes virais pesquisados, incluindo o SenV-A (LEME et al., 2015).

Paralelamente, os estudos conduzidos nos EUA a partir de duas amostras de fluido vesicular e duas amostras de soro provenientes de rebanhos suínos dos estados de Minas Gerais e Goiás e acometidos pela doença vesicular confirmaram a presença do SenV-A nos animais avaliados, por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) (VANNUCCI et al., 2015).

Baseando-se nos resultados negativos para outras importantes doenças vesiculares suínas, na epidemiologia dos surtos e na detecção do genoma do SenV-A em animais acometidos, este vírus foi considerado como o mais provável agente causal da doença vesicular suína relatada nos rebanhos brasileiros (LEME et al., 2015, VANNUCCI et al., 2015). Estes foram os primeiros relatos da presença do SenV-A fora do território norte-americano, o que sugere que o vírus seja um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira (LEME et al., 2015, VANNUCCI et al., 2015).

Simultaneamente aos casos de doença vesicular que estavam ocorrendo no Brasil, também foram relatados aumentos nas taxas de mortalidade em leitões neonatos, ou seja, entre um e cinco dias de idade de granjas dos estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul (VANNUCCI et al., 2015, LEME et al., 2016). Os sinais clínicos relatados nos leitões incluíam letargia, hiperemia cutânea, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita. Leitões dos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul que apresentaram morte espontânea foram submetidos à investigação diagnóstica e apresentaram resultados positivos para o SenV-A em diferentes órgãos/tecidos, tanto pela

técnica de RT-PCR quanto por imunohistoquímica. Entre os achados histopatológicos, as lesões predominantes foram pneumonia intersticial, glossite necrotizante, miocardite e encefalite. Infecções por outros agentes virais responsáveis por um ou mais dos sinais clínicos relatados, como os picornavírus entéricos suínos (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), parvovírus suíno (PPV), *Circovirus suíno-tipo 2* (PCV2), *Rotavirus A* (RVA), *B* (RVB), *C* (RVC) e *H* (RVH), *Vírus da diarreia epidêmica dos suínos* (PEDV), *Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos* (TGEV) e o *Deltacoronavírus suíno* (SDCoV) foram descartadas após resultados negativos em testes diagnósticos realizados a partir de amostras dos mesmos animais (LEME et al., 2016).

Os resultados das investigações histopatológicas, imunohistoquímicas e moleculares demonstraram a participação do *Senecavirus A* em múltiplas lesões observadas nos leitões de maternidade, o que mostrou a suscetibilidade de suínos jovens à infecção pelo vírus (LEME et al., 2016). Dessa maneira, a infecção pelo SenV-A revelou-se muito importante também para essa categoria de produção.

1.6 *SENECAVIRUS A* FORA DO CONTINENTE AMERICANO

No verão de 2015, na China, suínos de granjas localizadas na província de Guangdong apresentaram doença vesicular, incluindo úlceras nas cavidades oral e nasal, anorexia, laminite e morte aguda de leitões neonatos. As amostras derivadas desses surtos foram negativas para as doenças vesiculares clássicas; entretanto, apresentaram resultados positivos para o SenV-A pela técnica de RT-PCR (WU et al., 2016). De acordo com o que se conhece na literatura atual, não há outros estudos que relatam a infecção pelo SenV-A fora do continente americano.

1.7 DIAGNÓSTICO

Os poucos estudos sobre o SenV-A utilizaram, principalmente, a técnica molecular de RT-PCR como método de diagnóstico. Knowles e Hallenbeck (2005) descreveram a técnica da *pan*-PCR como sendo de grande valor para a identificação inicial de novos candidatos de picornavírus. Entretanto, a técnica torna-se dispendiosa devido ao número de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), especialmente aqueles com bases degeneradas e/ou alternativas, necessários para o seu desenvolvimento. Entre os demais estudos baseados em RT-PCR, dois deles descreveram o conjunto de *primers* utilizado na RT-PCR para a amplificação das regiões VP3/VP1 e/ou 2A do genoma do SenV-A (KNOWLES et al., 2006, LEME et al., 2015)

Yang; Van Bruggen e Xu (2012) estabeleceram, por meio da produção de cinco anticorpos monoclonais contra o SenV-A, as técnicas de ELISA e imunohistoquímica como ferramentas adicionais de diagnóstico do vírus. Entretanto, não há estudos posteriores que se basearam nas técnicas descritas por este estudo ou que tenham utilizados os anticorpos monoclonais produzidos por este grupo de pesquisa.

Em 2016, a técnica de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) com SYBR Green foi descrita em um estudo que avaliou amostras de suínos com e sem sinais clínicos de doença vesicular. A RT-qPCR mostrou-se como uma técnica rápida, específica, sensível e quantitativa para a detecção do RNA do SenV-A, permitindo o diagnóstico da infecção a partir de um grande número de amostras (BRACHT et al., 2016).

1.8 CONCLUSÃO

Estudos baseados na infecção pelo SenV-A são escassos em todo o mundo. A infecção por este agente viral pode ter sido considerada negligenciada, uma vez que suínos foram considerados hospedeiros naturais do vírus, ao qual não foi, inicialmente, associada uma patologia específica (KNOWLES et al., 2006). Entretanto, os casos esporádicos de doença vesicular idiopática suína relatados nos EUA (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008, SINGH et al., 2012) e, recentemente, no Brasil (LEME et al., 2015, 2016; VANNUCCI et al., 2015) e na China (WU et al. 2016) alertam para o potencial patogênico do SenV-A, que pode levar a perdas produtivas e econômicas. Adicionalmente, o fato da infecção por esse vírus ser clinicamente indistinguível das infecções por agentes virais classicamente associados a doenças vesiculares, como a febre aftosa, a estomatite vesicular, o exantema vesicular suíno e a doença vesicular suína, todas de notificação obrigatória, ressalta a importância do diagnóstico da infecção.

Uma vez que as taxas de morbidade associadas à infecção pelo SenV-A são elevadas, é importante o estabelecimento de um protocolo rápido, sensível, específico, de baixo custo e de fácil implementação na rotina laboratorial de diagnóstico para o vírus, com o objetivo de minimizar as perdas econômicas desta infecção em rebanhos suínos.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2015. Relatório anual 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 29 de Março de 2016.
- AMASS S. F., SCHNEIDER J. L., MILLER C. A., SHAWKY S. A., STEVENSON G. W., WOODRUFF M. E. Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. **Journal of Swine Health Production**, 12, 192-196, 2004.
- AO, D., SUN, S.Q. e GUO, H.C. Topology and biological function of enterovirus non-structural protein 2B as a member of the viroporin family. **Veterinary Research**, v. 45, p. 87, 2014.
- BRACHT, A.J., O'HEARN, E.S., FABIAN, A.W., BARRETTE, R.W. e SAYED, A. Real-Time reverse transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens. **PLoS One**, v. 11, p. e0146211, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 29 de Março de 2016.
- FERRER-ORTA, C., FERRERO, D. e VERDAGUER, N. RNA-dependent RNA polymerases of picornaviruses: from the structure to regulatory mechanisms. **Viruses**, v. 7, p. 4438-4460, 2015.
- FLATHER, D. e SEMLER, B.L. Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 594, 2015.
- GONZALEZ-MAGALDI, M., MARTIN-ACEBES, M.A., KREMER, L. e SOBRINO, F. Membrane topology and cellular dynamics of foot-and-mouth disease virus 3A protein. **PLoS One**, v. 9, p. e106685, 2014.
- HALES, L.M., KNOWLES, N.J., REDDY, P.S., XU, L., HAY, C. e HALLENBECK, P.L. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1265-1275, 2008.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Virus taxonomy: 2014 release Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 01 de Junho de 2015.
- JIANG, P., LIU, Y., MA, H.C., PAUL, A.V. e WIMMER, E. Picornavirus morphogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, p. 418-437, 2014.
- KNOWLES, N.J. The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. **The Veterinary Record**, v. 122, p. 441-442, 1988.

KNOWLES, N.J. e HALLENBECK, P.L. 2005. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, p. A14.

KNOWLES, N.J., HALES, L.M., JONES, B.H., LANDGRAF, J.G., HOUSE, J.A., SKELE, K.L., BURROUGHS, K.D. e HALLENBECK, P.L. 2006. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. EUROPIC 2006: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saariselkä, Inari, Finland, p. G2.

LAGER, K.M. e MENGELING, W.L. Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 357-359, 1994.

LEME, R.A., ZOTTI, E., ALCANTARA, B.K., OLIVEIRA, M.V., FREITAS, L.A., ALFIERI, A.F. e ALFIERI, A.A. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 603-611, 2015.

LEME, R.A., OLIVEIRA, T.E.S., ALCÂNTARA, B.K., HEADLEY, S.A., ALFIERI, A.F., YANG, M. e ALFIERI, A.A. Clinical manifestations associated with Senecavirus A in neonatal pigs. **Emerging Infectious Diseases**, DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151583>, 2016.

MARTINEZ-SALAS, E., FRANCISCO-VELILLA, R., FERNANDEZ-CHAMORRO, J., LOZANO, G. e DIAZ-TOLEDANO, R. Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. **Virus Research**, v. 206, p. 62-73, 2015.

MIRMOMENI, M.H., HUGHES, P.J. e STANWAY, G. An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. **Journal of Virology**, v. 71, p. 2363-2370, 1997.

OIE. Animal Health in the World - Overview. 2015a. Disponível em: < <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/> >. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2015.

PASMA, T., DAVIDSON, S. e SHAW, S.L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 84-85, 2008.

PAUL, A.V. e WIMMER, E. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. **Virus Research**, v. 206, p. 12-26, 2015.

SINGH, K., CORNER, S., CLARK, S.G., SCHERBA, G. e FREDRICKSON, R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 3, p. 1-3, 2012.

SUN, Y., GUO, Y. e LOU, Z. Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex. **Current Opinion in Virology**, v. 9, p. 24-30, 2014.

USAHA – United States Animal Health Association. Committee on transmissible diseases of swine - Research on Seneca Valley Virus. 116th Annual Meeting, pp. 1-2. United States Animal Health Association, Greensboro, NC. Disponível em <http://www.usaha.org/Portals/6/Resolutions/2012/resolution14-2012.pdf>. Acesso em 09.03.2015

VANNUCCI, F.A., LINHARES, D.C., BARCELLOS, D.E., LAM, H.C., COLLINS, J. e MARTHALER, D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 589-593, 2015.

WHITAKER, H.K., NEU, S.M. e PACE, L.W. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 244-246, 1990.

WU, Q., ZHAO, X., CHEN, Y., HE, X., ZHANG, G. e MA, J. Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China. **Genome Announcements**, v. 4, 2016.

YANG, M., VAN BRUGGEN, R. e XU, W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 42-50, 2012.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e avaliar um protocolo de *nested*-PCR para a detecção do RNA do *Senecavirus A* em leitões com síndrome multissistêmica neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar, a partir de um produto de RT-PCR previamente estabelecida, um par de *primers* interno que será utilizado em sistema de *nested*-PCR para realizar a amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP1 do SenV-A;
- Padronizar a técnica de *nested*-PCR para a investigação da presença do SenV-A em amostras negativas na RT-PCR;
- Avaliar comparativamente os resultados da RT-PCR e da *nested*-PCR a partir das mesmas amostras biológicas.
- Avaliar a especificidade da técnica de *nested*-PCR por meio do sequenciamento dos produtos amplificados nas amostras biológicas avaliadas e por análise estatística.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 Development and evaluation of a nested-PCR assay for the detection of *Senecavirus*

A RNA in piglets with neonatal multisystemic syndrome.

**Development and evaluation of a nested-PCR assay for the detection of *Senecavirus A*
RNA in piglets with neonatal multisystemic syndrome.**

Abstract

Senecavirus A (SenV-A) is an emerging virus that has been associated with vesicular disease in weaned and adult pigs and with a multisystemic syndrome in piglets from different countries, such as the United States, Brazil, and China. This study aimed to establish a nested-PCR assay for the routine diagnosis of SenV-A infection in pigs. Tissue samples ($n=177$) were collected from 37 piglets of 18 pig farms located in four different Brazilian states of three distinct geographical regions. The RT-PCR assay was performed to amplify a 542 bp product size of VP3/VP1 regions of SenV-A genome. For the nested-PCR, a primer set was defined to amplify an internal VP1 fragment of 316 bp. Fifteen (40.5%) and 23 (62.2%) of the 37 piglets were positive for the SenV-A in the RT-PCR and nested-PCR assays, respectively. The SenV-A RNA was detected in 61 (34.5%) of the 177 samples with the RT-PCR, while the nested-PCR assay showed that 84 (47.5%) of the 177 samples were with the virus ($p<0.05$). Considering the results according to the herds, 11 (61.1%) and 16 (88.9%) of the 18 pig herds were positive for the SenV-A in the RT-PCR and nested-PCR assays, respectively. Nucleotide sequencing analysis revealed similarities of 98.7% to 100% among SenV-A Brazilian strains and of 86.6% to 98% with SenV-A strains from other countries, confirming the specificity of the amplicons. The nested-PCR assay in this study was suitable to recover the SenV-A RNA in biological specimens, piglets, and/or herds that were considered as negative in the RT-PCR assay, and is proposed for the routine investigation of the SenV-A infection, especially when other techniques are not available or when a great number of samples has to be examined for the virus presence.

Key Words: *Seneca Valley virus*, diagnostic, molecular detection, picornavirus infection, vesicular disease.

Introduction

Senecavirus A (SenV-A) belongs to the *Picornaviridae* family, *Senecavirus* genus. SenV-A is a non-enveloped virus that has single-stranded, positive-sense RNA genome with approximately 7.4 kb (HALES et al., 2008). The virus was first isolated as a cell-culture contaminant in 2002 and the first complete genome sequence was determined in 2005 (KNOWLES; HALLENBECK, 2005). Since then, SenV-A has been found in asymptomatic pigs throughout the United States (USA) (KNOWLES et al., 2006).

Since 2008 SenV-A infection has been associated with a porcine vesicular disease clinically indistinguishable from other important vesicular infections, such as foot-and-mouth disease (FMD), vesicular stomatitis (VS), and swine vesicular disease (SVD) (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008, SINGH et al., 2012). In 2015, outbreaks of SenV-A-associated vesicular diseases were reported from pigs of the USA (RADEMACHER et al., 2015), Brazil (LEME et al., 2015, VANNUCCI et al., 2015), and China (WU et al., 2016). Additionally, in these three countries SenV-A was associated with a neonatal multisystemic syndrome in pigs up to five days of age. In these cases, the clinical manifestations of affected piglets included lethargy, excessive salivation, cutaneous hyperemia, wasting, enteric and/or neurological clinical manifestation, some rapidly evolving to sudden death (VANNUCCI et al. 2015, LEME et al., 2016, WU et al., 2016). Leme et al. (2016) reported that the most frequent gross manifestations observed in ten piglets with the neonatal multisystemic syndrome were petechial hemorrhages of the kidney and ulcerative lesions at the tongue and coronary bands. The histopathological findings included diphtheric glossitis, interstitial pneumonia, lymphocytic myocarditis, ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder and the ureters, and lymphoplasmacytic encephalitis (LEME et al., 2016). In this same study, the SenV-A was detected by both immunohistochemical and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays in different tissues, including the

tongue, gingiva, small intestine, renal pelvis, urinary bladder, and cerebrum, suggesting a new clinical syndrome associated with SVA infection that resulted in disease to multiple tissues and organs of these piglets (LEME et al., 2016).

There are different diagnostic methods available for SenV-A detection, including serological, immunohistochemical (IHC) (KNOWLES et al., 2006, YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012, LEME et al., 2016), and molecular assays (LEME et al., 2015, VANNUCCI et al., 2015, BRACHT et al., 2016). Among these techniques, the end-point RT-PCR (KNOWLES, 2005, LEME et al., 2015, WU et al., 2016) and the next generation sequencing (NGS) (VANNUCCI et al., 2015, BRACHT et al., 2016) tools have been more used. Recently, a RT-quantitativePCR (RT-qPCR) assay was developed for the SenV-A detection and quantification from vesicular diagnostic tissues (BRACHT et al., 2016). Both the RT-qPCR and NGS assays have increased sensitivity and specificity, even compared with conventional RT-PCR assays; however, both techniques require specific equipment, expensive supplies, and skilled staff; therefore they are not readily available in most veterinary diagnostic laboratories. The nested-PCR assay also has increased sensitivity when compared with conventional RT-PCR, has increased reaction efficiency, is simple to be performed (SANDIN, 2002), and is a cost-effective diagnostic test; therefore the nested-PCR may represent a useful diagnostic tool, especially in the cases in which samples have been negative for the target infectious agent in the conventional RT-PCR. In this study a nested-PCR assay was designed and tested for the routine diagnosis of SenV-A infection.

Materials and methods

Sample collection

This study was conducted from March to December, 2015 and included 18 pig herds from 4 different states of 3 distinct geographical regions of Brazil: São Paulo (SP, Southeastern $n=2$), Mato Grosso do Sul (MS, Midwest, $n=1$), Paraná (PR, Southern, $n=4$), and Santa Catarina (SC, Southern, $n=11$) states (Table 1). Thirty-seven piglets up to 5 days of age with one or more of the clinical manifestations of lethargy, acute diarrhea, wasting, cutaneous hyperemia, excessive salivation, and/or neurological signs, and that died spontaneously were examined in this study.

Tissue/organ sections (tongue, gingiva, heart, lung, liver, spleen, kidney, urinary bladder, small intestine, and/or mesenteric lymph node, $n=177$) were collected freshly during routine necropsy and maintained at -80°C until processing. To avoid cross contamination, individual sets of necropsy equipment were used during sample collection.

Additionally, tissue ($n=20$) and fecal ($n=5$) samples of piglets ($n=5$) that were originated from one pig herd of SP ($n=2$), PR ($n=2$), and Rio Grande do Sul (RS; $n=1$) states and that had no history of vesicular disease in weaned and/or adult pigs nor neonatal multisystemic clinical manifestations in piglets were also included in this study.

Table 1. Sample collection from herds/piglets up to 5 days of age with neonatal multisystemic syndrome. Number of herds, piglets, and clinical samples submitted for the *Senecavirus A* diagnosis by nested-PCR assay according to the different regions/states of Brazil

| Brazilian geographical regions | Brazilian state | Number of evaluated (<i>n</i>) | | |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|---------|------------------|
| | | Herds | Piglets | Clinical samples |
| Southeast | São Paulo | 2 | 2 | 14 |
| Midwest | Mato Grosso do Sul | 1 | 1 | 4 |
| Southern | Paraná | 4 | 6 | 46 |
| | Santa Catarina | 11 | 28 | 113 |
| Total | | 18 | 37 | 177 |

Extraction of nucleic acids

The tissues were mechanically disrupted with MagNa Lyser Instrument (Roche Diagnostics™, Mannheim, Germany), homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and clarified by centrifugation at 3,000 x *g* for 10 min. Aliquots (200 µL) of tissue homogenates were pre-treated with 0.2 mg/mL proteinase K (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 1% sodium dodecyl sulfate (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Nucleic acid was extracted from all samples, including fecal suspensions (10-20% w/v) using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods (BOOM et al., 1990, ALFIERI et al., 2006). The extracted nucleic acid was eluted in 50 µL of ultrapure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Positive controls consisted of a viral isolate derived from a vesicular fluid sample and cultured in porcine kidney cells, lineage PK-15 (LEME et al., 2015) and of a SenV-A positive tissue from the tongue of a piglet (LEME et al., 2016), and the negative control consisted of

sterile ultrapure water; both were used in all the nucleic acid extraction and amplification procedures.

RT-PCR and nested-PCR amplification

For the SenV-A detection two rounds of PCR assays were performed. The RT-PCR was carried out using the primers SVV-2682FW (5'-TTCCA CTCCACCGACAACG-3') and SVV-3224RV (5'-GATACCTTCCCACCCTTGC-3') to amplify the partial (542 bp) SenV-A VP3/VP1 genomic region (LEME et al., 2015).

For the nested-PCR assay, forward SVV-2730FW (5'-ACTGACACCGATTCTCTG-3') and reverse SVV-3046RV (5'-CTAAAGTAAGTGAAACAGGC-3') primers were designed based on the *Senecavirus A* nucleotide (nt) sequences available on GenBank database to amplify an internal fragment of 316 bp of the SenV-A VP1 gene. The primer positions were defined based on the prototype SVV-01 (GenBank accession number NC_011349) complete genome sequence (Fig 1). The specificity of the SVV-2730FW and SVV-3046RV primers was tested *in silico* with nt sequences of other picornaviruses, such as FMD virus types A (GenBank accession numbers AY593752, AY593788, HQ832592), O (GenBank accession numbers AY593829, AJ320488, JN998085), C (GenBank accession numbers AY593810, FJ824812), SAT1 (GenBank accession number AY593839), SAT2 (GenBank accession number KM268897), SAT3 (GenBank accession number AY593853), and Asia 1 (GenBank accession numbers AY593795, AY304994, DQ989318), SVD virus (GenBank accession numbers KF963275, AF268065, D16364), *Teschovirus A* (GenBank accession numbers KC757344, JQ808131, AY392555, AF296103), *Sapelovirus A* (GenBank accession numbers KJ821019, JX286666), *Enterovirus G* (GenBank accession numbers NC_004441, Y14459), *Aichivirus C* (GenBank accession numbers KC424639, GU292559), *Pasivirus A* (GenBank accession numbers JQ316470, JX491648), and *Cardiovirus* (GenBank accession numbers KF771002,

NC_001479, AY296731, KM269482, JX683808, EU681179, DQ835185). Further, pig fecal samples that were previously known to be positive for other picornaviruses such as *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, and/or *Enterovirus G* (DONIN et al., 2014) were tested for *Senecavirus A* presence with the new primers herein.

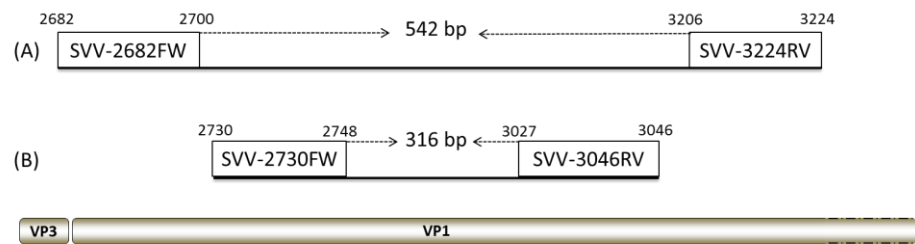


Fig. 1 Primer positions within the VP1 nucleotide sequence for the (A) RT-PCR (LEME et al., 2015) and (B) nested-PCR assays. GenBank accession number of the reference sequence: NC_011349.

The nested-PCR mix solution was prepared to a final volume of 50 μ L, containing 2 μ L of the RT-PCR product, 1x PCR buffer (20mM Tris-HCL pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM of total dNTP, 20 pmol of each primer SVV-2730FW and SVV-3046RV and 2.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). Amplification reactions were performed in a thermocycler (Swift™ MaxPro Thermal Cycler; Esco Healthcare Pte, Singapore, Singapore) at 94°C for 5 min for denaturation followed by 30 cycles of 94°C/1 min, 52°C/1 min and 72°C/1 min and final extension at 72°C for 7 min. The RT-PCR and nested-PCR amplified products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel in TBE buffer, pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), stained with ethidium bromide (0.5 g/mL) and visualized under UV light.

Sequence analysis

Nested-PCR amplicons, one of each farm, were submitted for sequencing analysis. The amplicons were purified with the Purelink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified with Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA) and sequenced in both directions with the nested-forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyzer with the Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were assembled using Phred/Phrap/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with nucleotide (nt) sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence identity matrix was performed using the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A phylogenetic tree based on nt was obtained using the maximum likelihood statistical method based on the kimura two-parameter model (MEGA v. 6), which provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with OpenEpi™ using Chi-square (χ^2) test to compare the proportions of SenV-A-positive samples between the RT-PCR and nested-PCR assays in this study. The confidence limit for the statistical tests was set at 95% ($p < 0.05$).

Results

The RT-PCR assay revealed that 40.5% (15/37) of the piglets examined in this study were positive for the SenV-A; tissue evaluation showed 34.5% (61/177) of the samples with the virus RNA, including the tissues from the tongue ($n=5$), gingiva ($n=3$), liver ($n=4$), and mesenteric lymph node ($n=2$) (Fig 2).

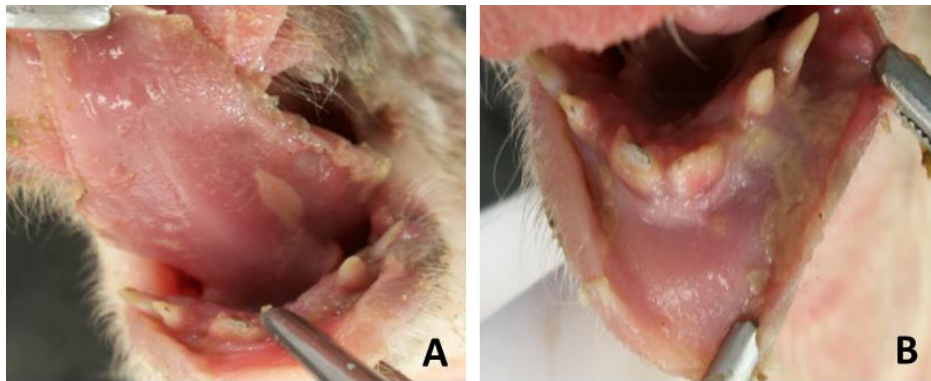


Fig. 2 Lesions from piglets that were positive for the *Senecavirus A* in the RT-PCR. (A) Diphtheric glossitis; B) Diphtheric gingivitis.

All samples included in this study were also submitted to the nested-PCR assay. Twenty-three (62.2%) of the 37 piglets were positive for the SenV-A in the nested-PCR assay. A total of 47.5% (84/177) of samples were positive for the virus, including all samples that were positive in the RT-PCR assay. Other 23 samples that were negative in the RT-PCR yielded positive results in the nested-PCR assay (Table 2). The tissues from the tongue, gingiva, liver, and mesenteric lymph node presented consistent SenV-A RNA detection in both RT-PCR and nested-PCR assays.

Table 2. *Senecavirus A* detection by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR assays from the different tissues/organs of 37 piglets at first week of age

| Tissue/organ | No. of samples evaluated | RT-PCR | | Nested-PCR | |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|
| | | Positive | Negative | Positive | Negative |
| Tongue | 6 | 5 | 1 | 5 | 1 |
| Gingiva | 3 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| Tonsil | 12 | 4 | 8 | 7 | 5 |
| Heart | 32 | 10 | 22 | 16 | 16 |
| Lung | 30 | 12 | 18 | 15 | 15 |
| Liver | 7 | 4 | 3 | 4 | 3 |
| Spleen | 21 | 3 | 18 | 7 | 14 |
| Kidney | 27 | 8 | 19 | 10 | 17 |
| Urinary bladder | 17 | 3 | 14 | 7 | 10 |
| Small intestine | 17 | 7 | 10 | 8 | 9 |
| Mesenteric lymph node | 5 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| TOTAL | 177 | 61 (34.5%)^a | 116 (65.5%) | 84 (47.5%)^b | 93 (52.5%) |

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

At farm level, 11 (61.1%) and 16 (88.9%) of the 18 pig herds were positive for SenV-A in the RT-PCR and nested-PCR assays, respectively. Herds from all the geographical regions and states included in this study were positive for the SenV-A.

Tissue and fecal samples of piglets that were originated from pig herds of SP, PR, and RS states and that had no history of vesicular disease in weaned and/or adult pigs nor neonatal multisystemic clinical manifestations in piglets were negative for the SenV-A RNA in both RT-PCR and nested-PCR assays.

The nt sequence analysis of the nested-PCR products confirmed the specificity of the amplicons. The comparisons of the nt sequences of in this study to each other and to other Brazilian strains available in GenBank (KT445973 to KT445977; KR063107 to KR063109; KR075677 and KR075678) showed similarities of 98.7% to 100%; when compared to foreign SenV-A nt sequences (NC_011349, EU271757, EU271758, EU271760, EU271763, KC667560, KT757282, KT321458) the similarities herein ranged from 86.8% to 98%.

The phylogenetic tree based on the partial (315 bp) VP1 nt sequences revealed that the SenV-A Brazilian strains in this study and the others available in GenBank grouped together to each other and separated from the SenV-A strains originated from other countries (Fig 3).

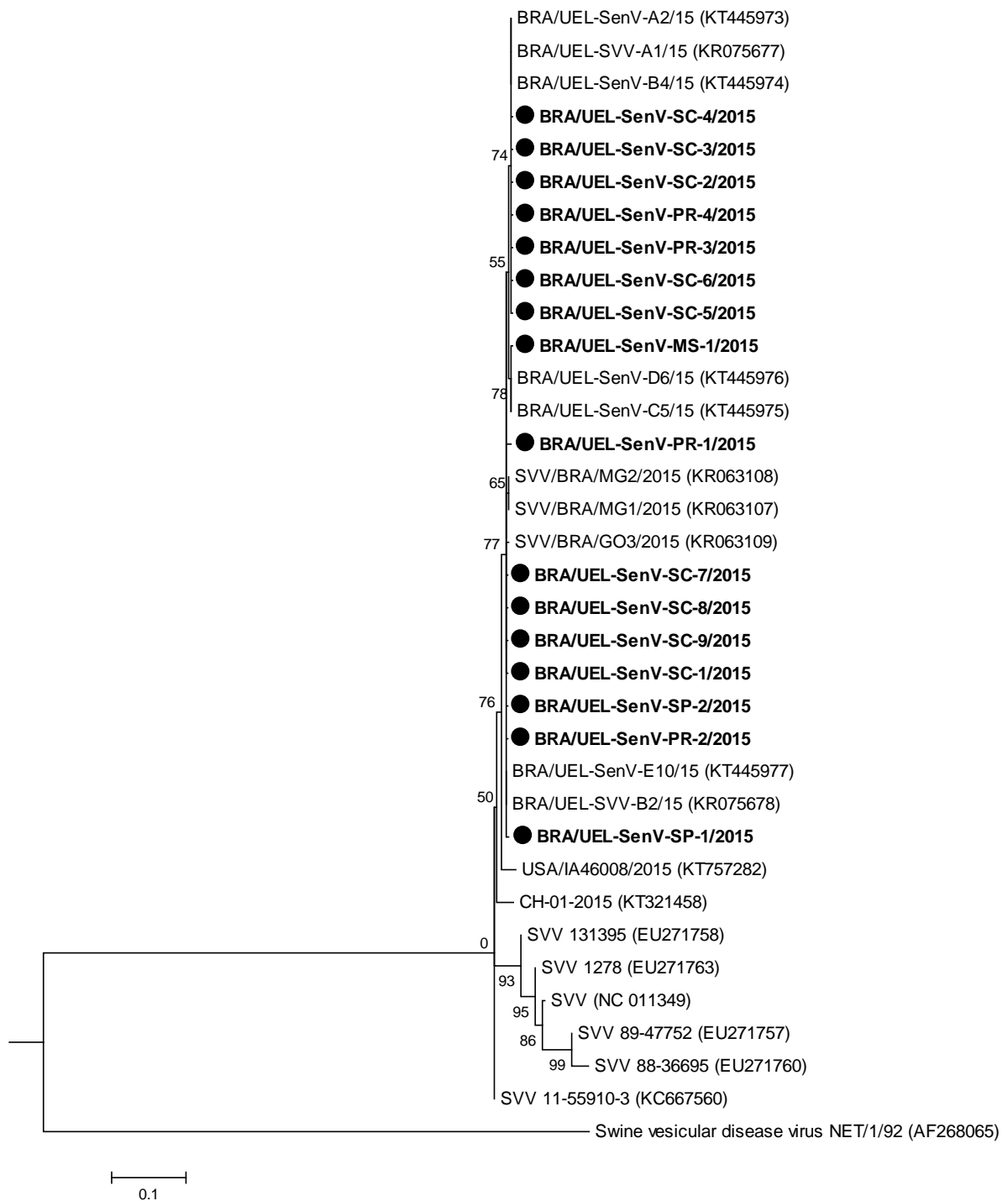


Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree constructed using the Kimura two-parameter model based on partial nt sequence (315 bp) of VP1 genomic region of the *Senecavirus A* strains in this study (black filled circle ●), of Brazil, and others available in GenBank. The accession numbers of representative sequences are indicated between parentheses. Bootstrap values were determined in 1,000 replications. A swine vesicular disease virus strain was used as outgroup.

Discussion

To the knowledge of the authors this is the first report of the establishment of a nested-PCR technique for the SenV-A RNA detection. The RT-PCR results in this study could have induced to an incorrect diagnostic interpretation, suggesting that some animals, tissues, and herds were negative for the SenV-A at the moment of the sample collection. However, the nested-PCR assay has recovered 8 piglets, 23 tissue samples, and 5 herds that were negative in the RT-PCR, with the specificity of the amplicons confirmed by the sequence analysis.

Different tests were developed for the SenV-A infection diagnosis, including virus isolation in cell culture, serological and IHC assays (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012, LEME et al., 2016). Both serological and IHC assays are not readily available. The virus isolation in cell culture is considered the gold standard for the laboratory diagnosis of viral infections. The use of traditional cell culture methods allows the detection of a variety of viruses in different cell lines, provide isolates for epidemiological, serological, and antiviral susceptibility testing-based studies, and has increased sensitivity over rapid antigen tests (HEMATIAN et al., 2016). However the virus isolation in cell culture also has some disadvantages, including the long time needed for incubation and observation of the cytopathic effect (CPE), the requirement of technical expertise to read CPE, and the high cost associated with the purchase and maintenance of different monolayer cells (LELAND; GINOCCHIO, 2007, HEMATIAN et al., 2016). The great number of samples suspected of being infected and that should be evaluated for the virus presence may be another difficult in using this approach. The molecular assays have been more frequently used for the SenV-A detection, likely because these methods are fast, specific, and sensitive. Molecular assays do not require the lengthy culture period and the blind passages needed for viral isolation in cell cultures and are useful for viruses that do not proliferate in standard cell cultures (LELAND; GINOCCHIO, 2007). Additionally, these techniques do not require infectious virus particle,

since they target the nucleic acid of the virus. The molecular techniques also allow for the genomic characterization of the virus, which is essential for identifying atypical and/or new field strains of viruses that might be circulating.

Different molecular assays for the SenV-A detection are available, such as conventional RT-PCR (LEME et al., 2015, WU et al., 2016), RT-qPCR (BRACHT et al., 2016), and NGS (VANNUCCI et al., 2015, BRACHT et al., 2016). Although the above mentioned advantages of these molecular techniques, in the regards of RT-qPCR and NGS assays there are also some disadvantages that may represent limitations in the routine diagnostics, such as the high cost of equipment and supplies and the requirement of skilled experts; therefore these both techniques are not largely used by the most of veterinary diagnostic laboratories.

As for the RT-qPCR and NGS assays, the nested-PCR technique also demonstrated increased sensitivity when compared with conventional RT-PCR. Additionally, the smaller size of the final amplicon produced in the nested-PCR assay increases the reaction efficiency (SANDIN, 2002), as well as the use of internal set of primers that anneal to the target genomic region at a different temperature relative to the first PCR round. The nested-PCR assay described in this study was more sensitive than the conventional RT-PCR without losing its specificity. Considering the results reported herein and the advantages and disadvantages of the viral diagnostic tests currently available for the SenV-A infection, this nested-PCR technique should be valuable for investigating the SenV-A presence directly from different biological samples, especially when virus isolation in cell culture is not available or when a great number of samples has to be examined for the virus.

Although the clinical history of vesicular lesions on the snout, hooves, and/or coronary band in all of the farms included in this study, symptomatic sows were not found at the moment of the sample collection in two of the herds from the Santa Catarina state evaluated herein. Accordingly, 46 samples from 10 piglets within these same herds presented negative results for the SenV-A in this investigation. On the other hand, 18 piglets that were sampled from 9 herds of the same state and with vesicular lesion-affected sows had positive results for the SenV-A. Based on these results, other etiology for the reported clinical signs from piglets are likely in the two herds in which symptomatic sows and SenV-A positive-piglets were not found.

Other four piglets included in this study were reported with no other clinical signs than acute diarrhea. These piglets were negative for the SenV-A, even presented in herds with symptomatic sows and SenV-A positive-sows and piglets. In these cases, Rotavirus A, B, C, and H were investigated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (HERRING et al., 1982) and the RVB electropherogroup was found in these three animals; the specificity of the PAGE-based results was confirmed by RT-PCR assays (MOLINARI et al., 2014) (data not shown). Further analyses of the samples from these piglets are being performed to clarify whether the RVB was the causative agent of the diarrhea.

The sequence analysis in this study showed a lower genetic variability within the SenV-A strains presented in Brazil. However, a SenV-A nt sequence that was isolated in the USA (EU271760) presented the greater difference from the Brazilian strains. The targeted genomic region in the nested-PCR assay herein might explain such nt sequence difference, since the VP1 is present on the external surface of the virus capsid and may be under a higher selection pressure (LEME et al., 2015). On the other hand, studies showed that the VP1 is conserved for the senecavirus (KNOWLES et al., 2006). The phylogenetic analysis herein showed that the SenV-A Brazilian strains grouped separated of the foreign SenV-A

sequences. It is likely that different strains of the SenV-A has emerged in the last years. However, further studies based on the complete genome sequence and on the biological properties of the SenV-A should be conducted to certainly assert about this.

In conclusion, this study describes a high sensitive and specific technique for the SenV-A detection. Since SenV-A is associated with vesicular disease in pigs and with a novel multisystemic syndrome in neonatal piglets, this method is proposed for the virus investigation in epidemiological studies and for health surveillance purposes by routine investigation of SenV-A in affected and non-affected pig herds.

References

- ALFIERI, A.A., PARAZZI, M.E., TAKIUCHI, E., MEDICI, K.C. and ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, p. 521-526, 2006.
- BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M. and VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.
- BRACHT, A.J., O'HEARN, E.S., FABIAN, A.W., BARRETTE, R.W. and SAYED, A. Real-Time reverse transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens. **PLoS One**, v. 11, p. e0146211, 2016.
- HALES, L.M., KNOWLES, N.J., REDDY, P.S., XU, L., HAY, C. and HALLENBECK, P.L. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1265-1275, 2008.

HEMATIAN, A., SADEGHIFARD, N., MOHEBI, R., TAHERIKALANI, M., NASROLAHI, A., AMRAEI, M., GHAFOURIAN, S. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 7, p. 77-82, 2016.

HERRING, A.J., INGLIS, N.F., OJEH, C.K., SNODFRASS, D.R. and MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 473-477, 1982.

Knowles, N. J. 2005: A pan-RT picornavirus RT-PCR: identification of novel picornavirus species. In: EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 23-29th May; Lunteren, The Netherlands: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; p. A06.

KNOWLES, N.J. and HALLENBECK, P.L. 2005. A new picornavirus is most closely related to cardiociruses. EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, p. A14.

KNOWLES, N.J., HALES, L.M., JONES, B.H., LANDGRAF, J.G., HOUSE, J.A., SKELE, K.L., BURROUGHS, K.D. and HALLENBECK, P.L. 2006. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. EUROPIC 2006: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saariselkä, Inari, Finland, p. G2.

LELAND, D.S. and GINOCCHIO, C.C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 49-78, 2007.

LEME, R.A., ZOTTI, E., ALCANTARA, B.K., OLIVEIRA, M.V., FREITAS, L.A., ALFIERI, A.F. and ALFIERI, A.A. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 603-611, 2015.

LEME, R.A., OLIVEIRA, T.E.S., ALCÂNTARA, B.K., HEADLEY, S.A., ALFIERI, A.F., YANG, M. and ALFIERI, A.A. Novel clinical manifestations associated with Senecavirus A in neonatal piglets. **Emerging Infectious Diseases**, DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151583>, 2016.

MOLINARI, B.L.D., LORENZETTI, E., OTONEL, R.A.A., ALFIERI, A.F. and ALFIERI, A.A. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 1019-1022, 2014.

PASMA, T., DAVIDSON, S. and SHAW, S.L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 84-85, 2008.

RADEMACHER, C., MADSON, D., MAIN, R., YOON, K.-J., LINHARES, D., PINEYRO, P., CANNING, P., BATES, J., CANNON, A. and HALBUR, P. American Association of Swine Veterinarians. 2015. Senecavirus A (Seneca Valley virus) in swine – breeding herd cases. Available in: <<https://www.aasv.org/news/story.php?id=8335>>. Accessed in September 08, 2015.

SANDIN, R.L. Molecular biology of infectious diseases. In: K. D. McClatchey. **Clinical Laboratory Medicine**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2002. 186-210.

SINGH, K., CORNER, S., CLARK, S.G., SCHERBA, G. and FREDRICKSON, R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 3, p. 1-3, 2012.

VANNUCCI, F.A., LINHARES, D.C., BARCELLOS, D.E., LAM, H.C., COLLINS, J. and MARTHALER, D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 589-593, 2015.

WU, Q., ZHAO, X., CHEN, Y., HE, X., ZHANG, G. and MA, J. Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China. **Genome Announcements**, v. 4, 2016.

YANG, M., VAN BRUGGEN, R. and XU, W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 42-50, 2012.

4 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O par de *primers* internos selecionado e avaliado nesse estudo em sistema de *nested-PCR* possibilitou a amplificação de um produto com 316 pb do gene que codifica a proteína VP1 do SenV-A.
- A técnica de *nested-PCR* foi capaz de resgatar resultados positivos para o SenV-A a partir de granjas, leitões e/ou amostras biológicas inicialmente consideradas negativas pela técnica de RT-PCR.
- Análises filogenéticas comparativas realizadas a partir de cepas de SenV-A identificadas nesse estudo confirmaram a especificidade dos produtos amplificados a partir da técnica de *nested-PCR*, demonstrando a especificidade da técnica.

ANEXOS

ANEXO A: Lista de Reagentes**Lista de Reagentes**

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
4. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
5. 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. 372,24 (Reagen[®])
6. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
7. Água DEPC (Dietyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
8. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
9. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
10. Azul de bromofenol (Sigma[®])
11. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
12. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma[®])
13. Brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
14. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
15. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
16. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
17. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
19. Dimetil sulfóxido (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Sigma[®])
20. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
21. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies[™])
22. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
23. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μL ; 25 μmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
24. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Invitrogen Life Technologies[™])
25. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
26. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merck[®])

27. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
28. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
29. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])
30. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
31. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
32. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
33. Metanol P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* SVV-2682FW (forward; 5'-TTCCACTCCACCGACAACG -3'; nucleotide (nt) 2682-2700) Leme *et al.* (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* SVV-3224RV (reverse; 5'-GATACCTTCCCACCCTTGC -3'; nucleotide (nt) 3206-3224) Leme *et al.* (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* SVV-2730FW (forward; 5'-ACTGACACCGATTTCTCTG -3'; nucleotide (nt) 2730-2748) This study - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* SVV-3046RV (reverse; 5'-CTAAAGTAAGTGAAACAGGC -3'; nucleotide (nt) 3027-3046) This study - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
38. PCR-buffer (5x) (20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40; 50% (v/v) glycerol)
39. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
40. SuperScript[™] III Reverse Transcriptase 200 units (Invitrogen Life Technologies[™])
41. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])
42. Proteinase K (10mM Tris; 1mM ethylenediamine tetra-acetic acid [EDTA]; 0.5% Nonidet P40; 1% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 0.2mg/ml proteinase K) (Invitrogen Life Technologies[™])
43. QuantIT[™] dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies[™])
44. Sacarose, P.A. – sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen[®])
45. Triton x-100
46. Vermelho de fenol ($\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$) P.M. 354,38 (Reagen[®])

ANEXO B: Soluções e Tampões

Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

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

-*Primer forward* SVV-2682FW

Sequência: 5´- TTCCACTCCACCGACAACG -3´

Posição: 2682-2700

Concentração: 41,1 nmoles

Data de fabricação: Fev / 2015

$$41,1 \times 1000 = 41100 \text{ pmoles}$$

$$41100 / 200 = 205,5$$

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

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

- *Primer reverse* SVV-3224RV

Sequência: 5´- GATACCTTCCCACCCTTGC – 3´

Posição: 3206-3224

Concentração: 30,7 nmoles

Data de fabricação: Fev / 2015

$$30,7 \times 1000 = 30700 \text{ pmoles}$$

$$30700 / 200 = 153,5$$

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

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

Nested-PCR para detecção da região VP1 do genoma do *Senecavirus A*

- *Primer forward*- SVV-2730FW

Sequência: 5' – ACTGACACCGATTTCTCTG – 3'

Posição: 2730-2748

Concentração: 56,2 nmoles

Data de fabricação: Set / 2015

$$56,2 \times 1000 = 56200 \text{ pmoles}$$

$$56200 / 200 = 281$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 281 μL de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- *Primer reverse* SVV-3046RV

Sequência: 5' – CTAAAGTAAGTGAAACAGGC – 3'

Posição: 3027-3046

Concentração: 57,6 nmoles

Data de fabricação: Set / 2015

$$57,6 \times 1000 = 57600 \text{ pmoles}$$

$$57600 / 200 = 288$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 288 μL de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque (100 mM) – 100 µL de cada dNTP
 - solução uso (10 mM) – 10 µL da solução estoque + 90 µL de água MilliQ autoclavada
- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 25 mL fenol saturado em água
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico
- **Gel de agarose 1%**
 - 0,5 g agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 20 µL de brometo de etídio
- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Ajustar o pH (pH 2,0)
 - Aliquotar e autoclavar
- **SDS 10%**
 - 5 g dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - água bidestilada q.s.p. 50 mL
- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton 100

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

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

 - **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
 - Tris 0,89 M
 - Ácido bórico 0,89 M
 - EDTA 0,02 M
 - água bidestilada q.s.p. 1 litro
 - ajustar o pH (pH 8,4)

 - **Tampão Fosfato Salina – PBS**
 - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)
 - 15 mM Potássio fosfato monobásico (KH₂PO₄)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL
-

ANEXO C: Protocolo de Técnicas

Protocolos de Técnicas

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

1. *Suspensão de tecido – extração bruta*

- 1,5 g do fragmento de órgão
- Macerar
- 15 mL PBS
- Vortexar
- Centrifugar a 3000 x g / 10 min
- Utilizar 200 µL do sobrenadante para extração

- 200 µL da suspensão do fragmento de órgão
- 10 µL de tampão de lise (Proteinase K)
- Homogeneizar em *vortex*
- Incubar a 56°C / 30 min
- Utilizar todo o volume para a extração do ácido nucléico

2. *Extração do ácido nucléico*

Fase I – Fenol

- 200 µL da suspensão de tecido
- Adicionar 20 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 400 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /15 min

- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em *vortex*
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1000 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 µL de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56°C (15 min)

- Adicionar 50 μL de água DEPC
 - Homogeneizar em *vortex*
 - Banho-maria 56°C/15 min
 - Homogeneizar em *vortex*
 - Centrifugar 13.000 x *g* /4 min
 - Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μL
 - Estocar -20°C até a utilização
- **Desnaturação – Transcrição reversa (RT)**
 - Mix de Desnaturação e RT para detecção parcial da região da VP1 do genoma do *Senecavirus A*

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

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

- **Reação em cadeia pela polimerase (PCR): 542 pb**

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

| Reagentes | Volume (μL) |
|--|--------------------------|
| Buffer 10 x (pH 8,4) | 5 |
| MgCl ₂ | 1,5 |
| dNTP (2,5 mM) | 1 |
| Platinun®Taq DNA Polymerase (5U/ μL) | 0,5 |
| Primer SVV-2682FW (20 pmol) | 1 |
| Primer SVV-3224RV (20 pmol) | 1 |
| Água | 36 |
| cDNA | 4 |
| Volume final | 50 |

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR

| Reação | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Tempo (min) | Nº de Ciclos |
|----------------|------------------------------------|-------------|--------------|
| Desnaturação | 94 | 5 | 1 |
| Desnaturação | 94 | 1 | 35 |
| Anelamento | 55 | 1 | 35 |
| Extensão | 72 | 1 | 35 |
| Extensão final | 72 | 7 | 1 |

- **Nested-PCR: 316 pb**

- Mix de PCR para a amplificação interna da região parcial da VP1 do genoma do *Senecavirus A*

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| <i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4) | 5 |
| MgCl ₂ | 1,5 |
| dNTP (2,5 mM) | 1 |
| <i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase (5U/µL) | 0,5 |
| Primer SVV-2730FW (20 pmol) | 1 |
| Primer SVV-3046RV (20 pmol) | 1 |
| Água | 38 |
| cDNA | 2 |
| Volume final | 50 |

- Ciclos de tempo e temperatura da nested-PCR

| Reação | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Nº de Ciclos |
|----------------|------------------|-------------|--------------|
| Desnaturação | 94 | 5 | 1 |
| Desnaturação | 94 | 1 | 30 |
| Anelamento | 52 | 1 | 30 |
| Extensão | 72 | 1 | 30 |
| Extensão final | 72 | 7 | 1 |

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

- 1 g de agarose

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

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

São utilizados 5 µL do amplicon e 1 µL do tampão de amostra. A eletroforese sob voltagem (100V) e amperagem (80A) constantes ocorre em aproximadamente 50 min.

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

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 10 μL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel.
3. Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Centrifugar a $13.000 \times g$ / 30s
5. Transferir 600 μL da amostra com o *Capture buffer type 2* para um tubo coletor com coluna
6. Incubar em temperatura ambiente por 1 min
7. Centrifugar a $13.000 \times g$ / 30s
8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
9. Adicionar 500 μL do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
10. Centrifugar a $13.000 \times g$ / 30s
11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
12. Adicionar 30 μL do *Elution buffer type 6*
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
14. Centrifugar a $13.000 \times g$ / 1 min.
15. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C .

- **Quantificação de produto de PCR**

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

1. Preparar a solução Quant-iTTM *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iTTM em *Buffer Quant-iTTM* 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
2. Homogeneizar em *vortex*.
3. No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução Quant-iTTM *Working Solution* a 2 μL do fragmento de DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução Quant-iTTM *Working Solution* a 10 μL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução Quant-iTTM *Working Solution* a 10 μL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em *vortex* por 2-3 s

7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
 8. Realizar a leitura usando QubitTM fluorometer (InvitrogenTM Life Technologies, EUA)
 9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra
-

ANEXO D: Lista de *Softwares*

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
 - BLAST The Basic Local Alignment Search Tool
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
 - MEGA package software version 4.1
(<http://www.megasoftware.net/mega4/mega41.html>)
 - BioEdit software version 7.0.9.0
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
-