



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE SAPORITI

**ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO (2007-2016) DA
INFECÇÃO PELO *Senecavirus A* EM REBANHOS
SUÍNÍCOLAS BRASILEIROS**

Londrina
2017

VIVIANE SAPORITI

**ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO (2007-2016) DA
INFECÇÃO PELO *Senecavirus A* EM REBANHOS
SUÍNÍCOLAS BRASILEIROS**

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2017

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

Saporiti, Viviane .

ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO (2007-2016) DA INFECÇÃO PELO Senecavirus A EM REBANHOS SUINÍCOLAS BRASILEIROS / Viviane Saporiti. - Londrina, 2017.
73 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.
Inclui bibliografia.

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

VIVIANE SAPORITI

**ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO (2007-2016) DA
INFEÇÃO PELO *Senecavirus A* EM REBANHOS SUINÍCOLAS
BRASILEIROS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Everson Zotti
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC

Londrina, 10 de Março de 2017.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal (LabVir) e no Laboratório de Saúde Animal, Unidade de Biologia Molecular (LAMSA / BioMol), 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 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**

A Deus,
Aos meus pais, Maria e Luiz Carlos,
Ao meu namorado, João Vitor,
e ao irmão, Bruno.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar essa oportunidade, pelos ensinamentos e por se fazer presente em cada dia da minha vida!

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

À Raquel Arruda Leme por todos ensinamentos, correções, companheirismo e amizade.

Aos professores que constituíram as bancas de defesa e qualificação, Prof. Dr. Everson Zotti, Prof. Dr. Caio Abércio da Silva e Prof^a. Dr^a. Ana Angelita Sampaio Baptista, obrigada pelo seu tempo, dedicação e orientações.

Ao Prof. Dr. Caio Abércio da Silva, agradeço também a amizade e confiança em mim depositadas ao longo de todos os anos de graduação e pós-graduação.

À Juliana Tomasi Fritzen que dedicou seu tempo e atenção a me ensinar a técnica de vírus neutralização e por todo suporte dedicado a este trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório pelo companheirismo e auxílio.

Às amigas que sempre me incentivaram e por muitas vezes entenderam minha ausência. E, principalmente, à minha base, Luiz Carlos, Maria, Bruno, Valquíria e João Vitor, que nunca mediram esforços para me apoiar, que estiveram nos momentos de vitória e de dificuldade.

Muito obrigada!

SAPORITI, Viviane. **Estudo sorológico retrospectivo (2007-2016) da infecção pelo *Senecavirus A* em rebanhos suínocolas brasileiros** 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

RESUMO

O *Senecavirus A* (SVA) é o agente etiológico de doença vesicular em suínos, clinicamente indistinguível das infecções vesiculares virais clássicas, incluindo a febre aftosa. Os primeiros surtos de SVA no Brasil foram relatados em 2014. Entretanto, não se sabe se o vírus circulava no Brasil antes desse ano. Este estudo tem como objetivo a investigação retrospectiva da presença de anticorpos neutralizantes anti-SVA em soro de suínos provenientes de granjas de diferentes regiões brasileiras. As amostras de soro ($n = 505$) neste estudo foram agrupadas de acordo com a data de coleta no período anterior (2007-2013, $n = 258$) e posterior (2014-2016, $n = 247$) à detecção do SVA no país. Foram analisadas 12 granjas, das quais 8 e 4 foram amostradas antes e após os surtos de SVA no Brasil, respectivamente. Entre as propriedades que foram amostradas após os surtos de SVA, duas apresentaram animais com manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus. As outras duas granjas não apresentaram história clínica consistente de infecção pelo SVA. O teste de vírus neutralização (VN) foi realizado em triplicata para todas as amostras de soro, utilizando diluições de 2 vezes até 1: 4.096. Os 258 soros coletados antes de 2014 não foram detectados com anticorpos anti-SVA, enquanto 90/247 soros coletados durante e / ou após 2014 apresentaram títulos de anticorpos anti-SVA ≥ 64 e foram considerados positivos. Apenas as granjas com histórico clínico consistente de infecção por SVA tiveram animais com anticorpos contra SVA. Esses resultados apresentam evidências sorológicas robustas de que o SVA não estava presente nos rebanhos de suínos brasileiros antes do ano de 2014. Considerando que o SVA pode ser um agente causador de doença vesicular emergente que leva a perdas econômicas em diferentes países do mundo e que a infecção por SVA é clinicamente indistinguível das doenças vesiculares clássicas dos suínos, o estabelecimento de métodos de diagnóstico de SVA e medidas de vigilância em países afetados e não afetados são ações importantes.

Palavras-chave: Seneca Valley virus. Doença vesicular. Suínos. Vigilância. Vírus neutralização.

SAPORITI, Viviane. **A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for *Senecavirus A* infection in Brazilian pig herds.** 2017. 73 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science; Concentration Area: Animal Health) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

ABSTRACT

Senecavirus A (SVA) is the etiological agent of a vesicular disease in pigs, clinically indistinguishable of classical viral vesicular infections, including foot-and-mouth disease. The first outbreaks of SVA infection in Brazil were reported in 2014. However, it is not known whether the virus was circulating in Brazil before this year. The aim of this study is the retrospective investigation of anti-SVA neutralizing antibody presence in porcine sera obtained in herds of distinct Brazilian regions. Serum samples ($n=505$) in this survey were grouped according to the collection date in before (2007-2013, $n=258$) and after (2014-2016, $n=247$) SVA clinical history in the country. A total of 12 pig herds were analyzed, of which 8 and 4 were sampled before and after the SVA outbreaks in Brazil, respectively. Among the herds that were sampled after the SVA outbreaks, two presented animals with clinical manifestations associated with SVA infection. The other two pig herds did not present consistent clinical history of SVA infection. Virus neutralization (VN) test was performed in triplicate for all serum samples, using 2-fold dilutions up to 1:4096. All the 258 sera collected before 2014 were not detected with anti-SVA antibodies, while 90/247 sera that were collected during and/or after 2014 presented anti-SVA antibody levels ≥ 64 and were regarded as positive. Only the herds with consistent clinical history of SVA infection had animals with antibodies against SVA. These results present robust serological evidence that the SVA was not present in the Brazilian pig herds prior to the year 2014. Considering that SVA may be a causative agent of an emerging vesicular disease that leads to economic losses in different countries of the world and that the SVA infection is clinically indistinguishable of the classical vesicular diseases of swine, the establishment of SVA diagnosis methods and surveillance measures in affected and non-affected countries are important actions.

Keywords: Epidemiology. Picornavirus disease. Seneca Valley virus. Swine vesicular infection. Virus neutralization test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** – *Status* oficial da América do Sul quanto à ocorrência de febre aftosa (*foot-and-mouth disease* – FMD)..... 16
- Figura 2** - Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*..... 18

2. TEN YEARS (2007-2016) RETROSPECTIVE SEROLOGICAL SURVEY FOR *SENECAVIRUS A* INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS.

- Figure 1** – Anti-SVA neutralizing antibody titres in the 137 porcine serum samples collected in SVA affected pig herds regarded as positive (≥ 64 , $n=90$) or negative (< 64 , $n=47$) in the virus neutralization test 43

LISTA DE TABELAS

**1. TEN YEARS (2007-2016) RETROSPECTIVE SEROLOGICAL SURVEY FOR
SENECAVIRUS A INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS.**

Table 1 – Sera collection data according to the period (year), state of origin, and number of herds and samples for different pig categories, Brazil, 2007-2016	40
Table 2 – <i>Senecavirus A</i> virus neutralization test results in porcine serum distributed in each period (year) according to the herds and serum samples evaluated, Brazil, 2007-2016	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPE	Cytopathic effect (Efeito citopático)
Dpi	Days post-inoculation (Dias pós-inoculação)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
FMD	Foot-and-mouth disease (Febre aftosa)
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IHC	Immunohistochemistry (Imunohistoquímica)
IRES	Internal ribosome entry site (Sítio interno de entrada no ribossomo)
NGS	Next generation sequencing (Sequenciamento de nova geração)
OIE	World Organisation for Animal Health (Organização Mundial de Saúde Animal)
ORF	Open reading frame (Fase aberta de leitura)
PED	Porcine epidemic diarrhea (Diarreia epidêmica suína)
PFU	Plaque-forming unit (Unidade formadora de placa)
PIVD	Porcine idiopathic vesicular disease (Doença vesicular idiopática suína)
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos)
RT-PCR	

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1	INTRODUÇÃO	15
1.2	DOENÇAS VESICULARES EM SUÍNOS	15
1.3	PICORNAVIRUS	17
1.4	<i>SENECAVIRUS A</i>	17
1.4.1	Características do <i>Senecavirus A</i>	18
1.4.2	Doença Vesicular em Suínos Associada ao <i>Senecavirus A</i>	19
1.4.3	Patogenia e Sinais Clínicos	21
1.4.4	Vias de Eliminação	22
1.4.5	Imunidade	23
1.4.6	Diagnóstico	24
1.4.6.1	Diagnóstico molecular	25
1.4.6.2	Diagnóstico sorológico	25
1.4.7	Considerações Finais	27
	REFERÊNCIAS	28
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	
	A Ten Years (2007-2016) retrospective serological survey for	
	<i>Senecavirus a</i> infection in Brazilian pig herds	36
	Abstract	37
	Introduction	38
	Materials and methods	39
	<i>Inclusion criteria for serum samples</i>	39
	<i>Virus neutralization test</i>	41
	<i>Statistical analysis</i>	41
	Results	42
	Discussion	43
	Conclusion	45

Acknowledgments	46
Conflicts of interests	46
References	46
4 CONCLUSÕES	51
CONCLUSÕES.....	52
ANEXOS	53
ANEXO A: Lista de Reagentes	54
ANEXO B: Soluções e Tampões	56
ANEXO C: Protocolo de Técnicas	60
ANEXO D: Lista de <i>Softwares</i>	68
ANEXO E: Formato do Periódico	69

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo. Este destaque em produção e produtividade se deve às boas práticas em sanidade, nutrição, genética, reprodução e manejo adotados em toda a cadeia produtiva de suínos. Adicionalmente, a produção integrada e o aprimoramento da gestão dos produtores maximizam a produtividade (BRASIL, 2016). Em 2015 o Brasil produziu 3,643 milhões de toneladas de carne suína dos quais 546 mil toneladas foram exportadas, e se estima que em 2016 a produção tenha aumentado para 3,775 milhões de toneladas (ABCS, 2016).

Com a intensificação da produção surgem novos desafios relacionados à alta densidade populacional dos animais na cadeia produtiva de suínos, destacando-se entre elas, as doenças infecciosas.

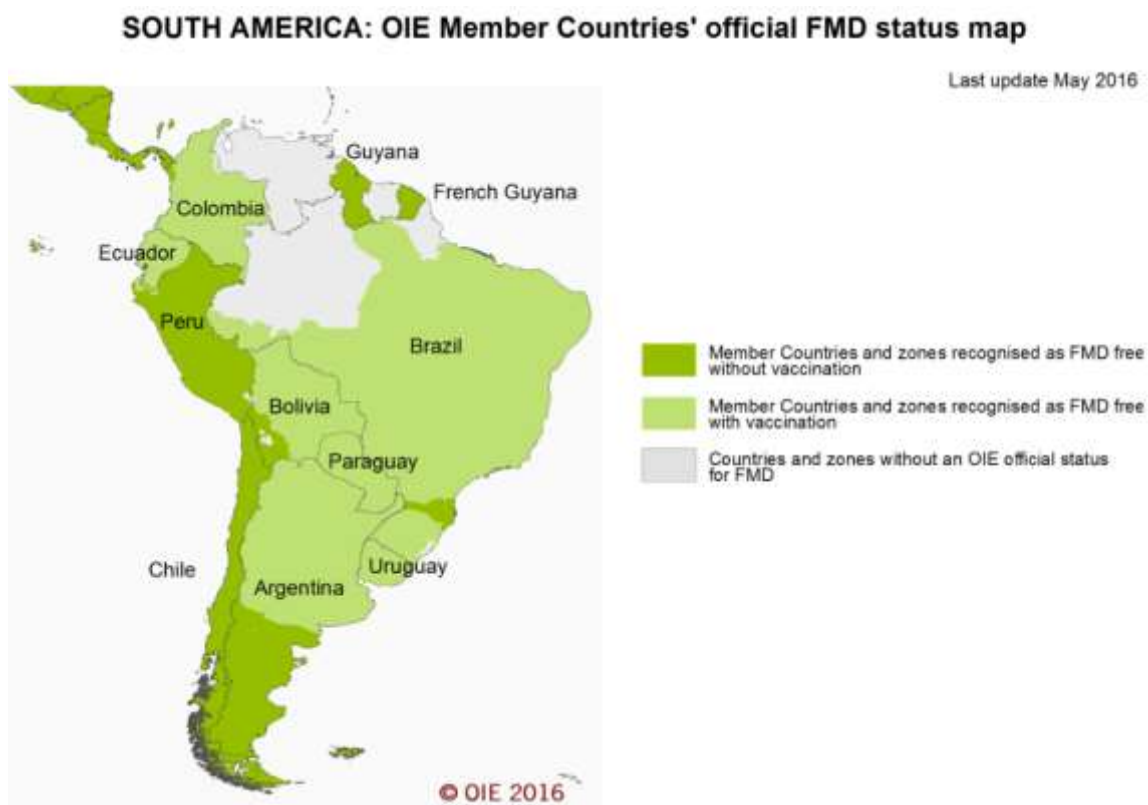
1.2 DOENÇAS VESICULARES EM SUÍNOS

Desde 1998 a Organização Mundial do Comércio (*World Trade Organization – WTO*) responsabilizou a Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health – OIE*) para o reconhecimento oficial de países e áreas livres de doenças específicas que representem barreiras sanitárias e que possam, direta ou indiretamente, comprometer o comércio internacional de animais e produtos de origem animal. O reconhecimento oficial aplica-se a seis doenças principais, entre elas as doenças vesiculares, destacando a mais importante que é a febre aftosa (*Foot-and-mouth disease – FMD*) (OIE, 2017b). Por ser uma doença viral altamente contagiosa e por apresentar grande potencial em causar graves perdas econômicas, a FMD foi a primeira doença para qual a OIE estabeleceu essa diretriz. Desta maneira, as demais doenças vesiculares, ou seja, a doença vesicular suína (*Swine vesicular disease – SVD*), a estomatite vesicular (*Vesicular stomatitis – VS*) e o exantema vesicular suíno (*Vesicular exanthema of swine – VES*), por apresentarem sinais clínicos indistinguíveis aos da FMD (LEME et al., 2015; VANUCCI et al., 2015), tornam-se de comunicação obrigatória por constituírem-se em diagnósticos diferenciais obrigatórios da FMD (OIE, 2017b).

A espécie suína é suscetível a todos os agentes virais que causam as doenças vesiculares de notificação obrigatória à OIE. Após a primeira descrição do *Senecavirus A* (HALES et al., 2008), este vírus também passou a ser considerado agente etiológico de doença vesicular em suínos (LEME et al., 2015; PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008; SINGH et al., 2012).

Os vírus da FMD e da SVD pertencem à família *Picornaviridae*, assim como o *Senecavirus A*. A FMD é endêmica em vários países da Ásia, África e Oriente Médio. A Austrália, Nova Zelândia, Indonésia, América do Norte e Europa Ocidental estão, atualmente, livres da doença, porém, o vírus pode ocorrer esporadicamente em áreas consideradas tipicamente livres. Na América Latina, como mostra a Figura 1, as regiões são classificadas como zonas livres com e sem vacinação, e a doença ainda continua endêmica em alguns países (OIE, 2017a). O último relato oficial da ocorrência de FMD no Brasil foi em 2006 (OIE, 2016). A SVD já foi relatada em países da Europa, entretanto a doença nunca foi relatada nas Américas e o seu *status* sanitário para países da Ásia não é reconhecido (OIE, 2013).

Figura 1 - *Status* oficial da América do Sul quanto à ocorrência de febre aftosa (*foot-and-mouth disease* – FMD)



Fonte: Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, 2016 (<http://www.oie.int/>)

SVA foi descrito no Brasil pela primeira vez no final de 2014 e início de 2015, associado a lesões vesiculares e causando danos às produções suínolas brasileiras (LEME et al., 2015; VANUCCI et al., 2015). Devido aos danos causados pelo agente infeccioso e aos sinais clínicos serem indistinguíveis daqueles apresentados por outras doenças vesiculares virais, é de grande importância o estudo do *status* sanitário dos rebanhos suínos brasileiros em relação à infecção pelo SVA, assim como monitorar o perfil imunológico atual e retrospectivo do plantel brasileiro.

1.3 PICORNAVIRUS

A família *Picornaviridae* possui, atualmente, 31 gêneros (ICTV, 2015). O nome dessa família deriva do latim, em que *pico* significa pequeno, uma referência ao tamanho da partícula viral, enquanto RNA é uma referência ao seu genoma de ácido ribonucleico (COROCCI; BAKKALI-KASSIMI, 2012). Os picornavírus são pequenos, entre 27-30 nm de diâmetro, e não possuem envelope. O capsídeo icosaédrico é formado por 60 protômeros de três ou quatro polipeptídeos (HALES et al., 2008).

Os picornavírus têm representantes capazes de infectar muitas espécies de vertebrados, como humanos, primatas não humanos, bovinos, suínos, equinos, roedores e aves (CARDETI et al., 2016), podendo causar doenças em muitas dessas espécies. Os picornavírus que acometem suínos pertencem aos gêneros *Aphthovirus* (ALEXANDERSEN et al., 2003), *Cardiovirus* (CARDETI et al., 2016), *Enterovirus* (DONIN et al., 2014), *Kobuvirus* (RIBEIRO et al., 2013), *Pasivirus* (YU et al., 2013), *Sapelovirus* (DONIN et al., 2014), *Senecavirus* (LEME et al., 2015) e *Teschovirus* (DONIN et al., 2014).

1.4 SENECAVIRUS A

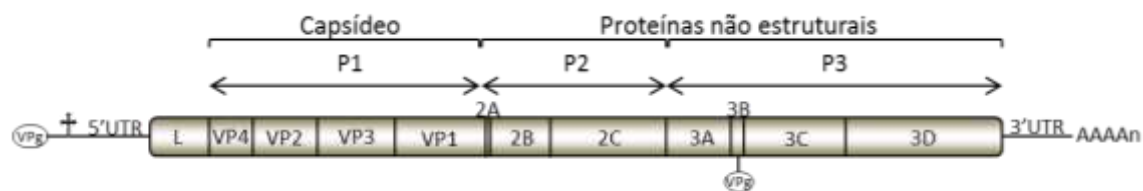
SVA anteriormente denominado *Seneca Valley virus* (SVV), foi isolado pela primeira vez em 2002 de forma casual a partir de cultivo celular (HALES et al., 2008; KNOWLES et al., 2006). Acredita-se que o agente foi introduzido acidentalmente como contaminante de soro fetal bovino ou tripsina suína utilizados no meio de cultura celular (HALES et al., 2008).

Em 2005 o genoma completo do vírus foi estabelecido, o que permitiu identificar semelhanças genéticas e de propriedades bioquímicas entre SVA e os cardiovírus (KNOWLES; HALLENBECK, 2005). Entretanto, com base em análises filogenéticas comparativas, foi estabelecido um novo gênero para abrigar o SVA, denominado gênero *Senecavirus* (HALES et al., 2008; KNOWLES; HALLENBACK, 2005).

1.4.1 Características do *Senecavirus A*

SVA tem tamanho aproximado de 27 nm de diâmetro e o seu genoma possui aproximadamente 7,3 kb. O genoma do SVA é composto por RNA de fita simples e polaridade positiva (VENKATARAMAN et al., 2008), que possui uma única sequência aberta de leitura (*Open reading frame* – ORF), flanqueada por regiões não traduzidas (UTR) nas suas extremidades 5' e 3'. Entre a região 5' UTR e o início da poliproteína está a proteína *Leader* (L), cuja função ainda não foi estabelecida (HALES et al., 2008). A ORF codifica uma poliproteína que virtualmente é dividida em três regiões, denominadas P1, P2 e P3. A P1 codifica quatro proteínas estruturais, denominadas VP4, VP2, VP3 e VP1 (WILLCOCKS et al., 2011). Apesar do papel patogênico das proteínas do SVA ainda serem desconhecidos, a VP1 é considerada a proteína mais imunogênica em vírus da família *Picornaviridae* (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016). As regiões P2 e P3 codificam as proteínas não estruturais do vírus, das quais três são codificadas pela P2 e quatro pela P3 (WILLCOCKS et al., 2011). Portanto, a estrutura genômica do SVA é típica de outros picornavírus, com o padrão L-4-3-4, como mostra a Figura 2 (HALES et al., 2008).

Figura 2 - Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*.



Fonte: Elaborado pelo autor

A região 5'UTR possui uma proteína covalentemente ligada à ela, denominada VPg (HALES et al., 2008; WILLCOCKS et al., 2011), que provavelmente possui função

na tradução do RNA viral (HALES et al., 2008; SEGALÉS et al., 2017). Já a porção 3'UTR possui uma cauda poliadenilada (HALES et al., 2008).

Durante o processo de replicação, o RNA do SVA é reconhecido pelos ribossomos através de uma estrutura localizada também na região 5'UTR, denominada sítio interno de entrada dos ribossomos (*internal ribosomal entry site*, IRES) tipo IV (WILLCOCKS et al., 2011).

Apesar dos poucos estudos disponíveis, já se sabe que SVA se adapta ao crescimento em cultivo celular *in vitro* e pode crescer em diferentes linhagens celulares (SEGALÉS et al., 2017) como células de testículo suíno (*swine testis* - ST), células renais suínas (*swine kidney* - SK-RST e *porcine kidney* - PK-15) e células cancerígenas de pulmão humano (NCI-H1299) (LEME et al., 2015; SEGALÉS et al., 2017; YANG et al., 2012). Em estudo comparativo entre três linhagens celulares (ST, SK-RST e NCI-H1299), a mais permissiva à infecção pelo SVA foi a NCI-H1299, que produziu alto título viral (10^9 PFU/mL – unidade formadora de placa) após 24 h de inoculação (YANG et al., 2012). Entretanto as demais linhagens celulares também podem ser utilizadas com sucesso para estudos com SVA (BRACHT et al., 2016; GOOLIA et al., 2017; LEME et al., 2015).

Algumas características específicas do vírus ainda são desconhecidas, como a estabilidade frente à diferentes faixas de pH, atuação de macromoléculas celulares como receptores e correceptores, e ciclo de replicação (SEGALÉS et al., 2017).

1.4.2 Doença Vesicular em Suínos Associada ao *Senecavirus A*

Em 2004 foram descritos surtos de doença vesicular em suínos de maternidade, creche e terminação no estado de Indiana, EUA. Não foi encontrada nenhuma evidência dos agentes causadores de doenças vesiculares clássicas e de notificação obrigatória (FMD, VS, SVD e VES). A etiologia da doença não foi estabelecida, portanto, a doença foi denominada Doença Vesicular Idiopática Suína (*Porcine Idiopathic Vesicular Disease* – PIVD) (AMASS et al., 2004).

Casos de PIVD já haviam sido descritos em várias regiões do mundo, como nos EUA, Austrália e Nova Zelândia nos anos 1980 (GIBBS et al., 1983; MONTGOMERY et al., 1987; MUNDAY et al., 1982). No Reino Unido em 2007 (ISID, 2007) e na Itália

em 2010 (SENSI et al., 2010) também foram descritos relatos de doença vesicular de etiologia desconhecida em suínos. Um estudo sorológico retrospectivo, conduzido nos EUA (1988-2008), detectou que a cepa SVV-001 e outras 12 cepas do SVA são comuns e amplamente distribuídas em suínos daquele país (HALES et al., 2008), independentemente da manifestação clínica de doença.

Em 2007, suínos provenientes de sete granjas de Manitoba, Canadá, foram transportados até Minnesota, EUA. Os animais apresentavam erosões e vesículas em pele, focinho, cavidade oral e banda coronária. Os testes diagnósticos foram negativos para os vírus vesiculares clássicos e positivos para SVA, que passou a ser considerado o possível agente etiológico da doença (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008). Em 2012, outro relato nos EUA também sugeriu que a doença vesicular poderia estar associada à infecção pelo SVA (SINGH et al., 2012).

No final de 2014, no Brasil, suínos de creche, terminação e reprodutores apresentaram doença vesicular clinicamente indistinguível daquelas causadas pelos vírus da FMD, SVD, VS e VES (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015). SVA foi detectado tanto nos casos relatados nos estados do Paraná e Santa Catarina, que foram investigados por pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina por meio da técnica de RT-PCR e posterior isolamento viral (LEME et al., 2015), quanto nos casos dos estados de Minas Gerais e Goiás, que foram descritos por pesquisadores da Universidade de Minnesota, EUA, através do sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) (VANNUCCI et al., 2015). A princípio os animais apresentavam lesões vesiculares principalmente em focinhos, cavidade oral e em patas, principalmente na região de banda coronária (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015). Em um estudo posterior foram analisadas amostras de soro e tecido de suínos com manifestações clínicas de doença vesicular provenientes dos estados brasileiros de Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e Rio Grande do Sul por RT-PCR, sendo identificados também resultados positivos para SVA (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016).

Leitões lactentes também podem ser acometidos pelo SVA. No início de 2015, simultaneamente aos surtos de doença vesicular em suínos ocorridos no Brasil, houve aumento significativo das taxas de mortalidade de leitões com menos de uma semana de vida (LEME et al., 2016a, 2016b; VANNUCCI et al., 2015). As manifestações clínicas em leitões neonatos incluíam letargia, manifestações neurológicas e diarreia. A duração

dos sinais clínicos varia entre três e dez dias, na dependência do conjunto de sinais clínicos manifestados, podendo levar à morte ou à recuperação da doença (LEME et al., 2016a, 2016b; VANNUCCI et al., 2015).

Alguns meses após a detecção do SVA em leitões lactentes, creche e terminação no Brasil, a doença associada ao SVA também foi detectada na China, EUA e Canadá, especialmente em leitões de maternidade e em matrizes (CANNING et al., 2016; ISID, 2016; JOSHI et al., 2015; QIAN et al., 2016; WU et al., 2016a, 2016b; ZHANG et al., 2015).

1.4.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Pouco se conhece sobre a patogenia do SVA devido à recente associação do agente viral com a doença clínica. Em estudos experimentais, observou-se que o período de incubação do vírus é de quatro a cinco dias. O RNA do agente viral foi encontrado no soro dos suínos desafiados a partir de três dias pós-inoculação (dpi), confirmando assim a viremia nos animais, que durou aproximadamente sete dias nos dois experimentos (JOSHI et al., 2016b; MONTIEL et al., 2016). Um dos estudos demonstrou que as tonsilas dos animais experimentalmente infectados apresentavam carga viral mais alta que a dos demais tecidos analisados; o isolamento viral a partir de tecido de tonsila foi possível até 7º dpi, o que sugere que este seja um dos sítios primários de replicação do SVA (JOSHI et al., 2016).

O principal sinal clínico da doença associada ao SVA é a formação de vesículas, que podem se manifestar nas regiões de focinho, cavidade oral, pele e membros, principalmente na banda coronária dos suínos (LEME et al., 2015; SEGALÉS et al., 2017; SINGH et al., 2012). As vesículas aparecem como erupções e evoluem como vesículas que se rompem facilmente, formando úlceras que podem ser cobertas por um exsudato serofibrinoso. A cicatrização inicia-se por volta de sete dias e a regeneração completa do epitélio ocorre em aproximadamente duas semanas, podendo variar conforme a gravidade da lesão. As vesículas são observadas, principalmente, em matrizes e animais de terminação e podem ser precedidas por leve hipertermia (40,3 a 40,8 °C) e/ou laminite (JOSHI et al., 2016b; SEGALÉS et al., 2017).

SVA, particularmente em leitões, é considerado pantrópico, pois é responsável por causar doença multissistêmica em animais infectados precocemente, acometendo vários órgãos e tecidos (LEME et al., 2016a, 2016b). Os leitões também podem apresentar vesículas, porém os sinais clínicos também podem incluir diarreia aguda, salivação excessiva, hiperemia cutânea, letargia, morte súbita, tendo sido também descritos sinais neurológicos em leitões neonatos de um a cinco dias de idade (LEME et al., 2016a). Os leitões clinicamente acometidos podem ser provenientes de matrizes saudáveis, infectadas e com sinais clínicos, ou de matrizes já recuperadas. Em um período que pode variar de uma semana a um mês a mortalidade de leitões em granjas acometidas pela primeira vez pelo SVA pode variar entre 5 e 60% (SEGALÉS et al., 2017).

1.4.4 Vias de Eliminação

Pouco se sabe sobre as vias de eliminação do SVA, porém, após diversos surtos e alguns estudos experimentais, sabe-se que o agente viral pode ser detectado em diferentes secreções e excreções, como líquido vesicular, fluido oral, secreção nasal e fezes (GUO et al., 2016, JOSHI et al., 2016b, LEME et al., 2015). O líquido vesicular apresenta alta carga viral (GUO et al., 2016), o que sugere que o contato de um animal suscetível com líquido de vesícula ou com lesões vesiculares representam um importante meio de transmissão do SVA. Um dos estudos experimentais demonstrou que a secreção oral possuía carga viral mais alta que a secreção nasal e fezes, revelando a importância do fluido oral na disseminação do agente (JOSHI et al., 2016b).

A presença do RNA e de antígenos do SVA foram demonstrados por meio das técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica, respectivamente, em pelve renal e vesícula urinária de leitões infectados com o vírus, sugerindo que a urina possa ser uma via de eliminação/transmissão do vírus (LEME et al., 2016b).

Moscas domésticas e amostras de fezes e intestino delgado de roedores provenientes de granjas com e sem histórico de doença vesicular foram investigados para a presença do SVA. O RNA do SVA foi detectado em moscas domésticas provenientes de granjas sabidamente acometidas pelo vírus. Por outro lado, as amostras biológicas de roedores foram positivas para o vírus, tanto por RT-PCR quanto por isolamento viral, independentemente do *status* clínico observado nas granjas (JOSHI et al., 2016a), sugerindo que ratos e moscas possam ser meios de disseminação/transmissão do agente.

1.4.5 Imunidade

As primeiras detecções do SVA não foram relacionadas a doenças ou manifestações de sinais clínicos (HALES et al., 2008). O vírus foi identificado acidentalmente (HALES et al., 2008; KNOWLES et al., 2006) e pouco tempo depois utilizado como agente oncolítico em pesquisas para o tratamento do câncer, não sendo observada qualquer patologia específica em animais ou em humanos (HALES et al., 2008; REDDY et al., 2007), diferentemente do que vem ocorrendo na atualidade. Sendo assim, pesquisas estão sendo realizadas para o esclarecimento da patogenicidade do vírus e das suas características imunogênicas (CHEN et al., 2016), que ainda são pouco conhecidas.

O primeiro estudo a avaliar a imunidade induzida pelo vírus foi realizado por Knowles et al. (2006) que, por meio do teste de vírus neutralização (VN), encontrou anticorpos neutralizantes anti-SVA em ratos, bovinos e suínos sem sinais clínicos de doença. A partir de então, bovinos e suínos passaram a ser considerados possíveis hospedeiros naturais do vírus (KNOWLES et al., 2006).

Em 2012, por meio de infecção experimental de suínos com SVA, pôde-se observar pela técnica de ELISA indireto (ELISAI) a soroconversão dos animais a partir do 6º dpi, até mesmo nos animais que não apresentaram sinais clínicos da doença. Títulos séricos de Imunoglobulinas (Ig) M foram detectados a partir do 6º dpi, com concentração máxima até o 14º dpi e queda a partir de então, sendo indetectáveis no 21º dpi. Por outro lado, os títulos de IgG atingiram o pico aos 21 dpi que perdurou por 57 dias, período total do experimento (YANG et al., 2012).

Animais com nove semanas de idade e experimentalmente infectados com o SVA soroconverteram com 14 dpi (MONTIEL et al., 2016). Em outro estudo experimental, os animais foram desafiados aos quatro meses de idade com soroconversão identificada a partir do 5º dpi por meio do teste VN. Neste mesmo estudo, a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) revelou títulos séricos de IgG a partir do 10º dpi. Os títulos de anticorpos neutralizantes passaram a aumentar significativamente e simultaneamente à redução do quadro clínico, da viremia, da excreção viral e da carga viral nos tecidos dos animais infectados, o que sugere que os anticorpos neutralizantes

atuem na remoção do vírus. Os títulos de anticorpos neutralizantes continuaram altos até o fim do experimento (38 dpi) (JOSHI et al., 2016b).

Animais naturalmente acometidos pelo vírus também apresentaram soroconversão entre duas a três semanas após o início dos sinais clínicos em um surto de doença vesicular que ocorreu nos EUA. Neste estudo, a técnica utilizada foi a IFI e os títulos de anticorpos variaram entre 160 a 1.280 (GUO et al., 2016).

Em um estudo longitudinal realizado com matrizes naturalmente infectadas e seus respectivos leitões, foi avaliada a resposta imune através da detecção de títulos de IgG contra a proteína VP1 do SVA, por meio de ELISAI. Foi detectado aumento de anticorpos em matrizes entre a 2ª e 3ª semanas após o aparecimento de sinais clínicos e também anticorpos em 100% das matrizes, com ou sem sinais clínicos. No mesmo estudo, 3 semanas após o início dos sinais clínicos, o teste de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) não detectou cópias genômicas do vírus no soro das matrizes, sugerindo que a viremia possa ter sido debelada pelos anticorpos neutralizantes. Já nos leitões, a resposta sorológica foi maior nas 1ª e 2ª semanas após o início do surto, caindo entre a 4ª e a 6ª semana; não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos observados em leitões provenientes de matrizes com ou sem sinais clínicos da infecção pelo SVA (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016).

A avaliação longitudinal de amostras de soro coletadas em um intervalo de 180 dias durante o surto de doença vesicular associada ao SVA, em duas granjas de matrizes, revelou soroconversão dos animais a partir de sete dias após o início dos sinais clínicos e altos títulos de anticorpos até o final do período observacional, com declínio dos títulos em alguns animais (GOOLIA et al., 2017).

1.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico para SVA é de extrema importância devido ao fato da infecção causar doença vesicular semelhante e de sinais clínicos indistinguíveis aos de outras viroses vesiculares, como a FMD (LEME et al., 2015). Para realizar o diagnóstico do SVA podem-se utilizar técnicas já validadas, sendo algumas de origem molecular, outras sorológicas, além da hibridização *in situ* e da imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, essas duas últimas pouco utilizadas na rotina laboratorial.

1.4.6.1 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares são amplamente utilizadas para realização do diagnóstico do SVA. As técnicas de RT-PCR são as mais utilizadas, porém, existem algumas variações. O *pan*-PCR, por exemplo, consegue detectar novos picornavírus (KNOWLES; HALLENBECK, 2005). Já as técnicas de RT-PCR convencionais amplificam algumas regiões parciais ou completas do genoma viral, como 5'UTR e 3D (WANG et al., 2016), ou a região VP1 (LEME et al., 2015). O RT-qPCR, realizado com *SYBR Green* ou com *TaqMan* (BRACHT et al., 2016; CANNING et al., 2016; FOWLER et al., 2017; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; GUO et al., 2016; JOSHI et al., 2016b), e o NGS (FOWLER et al., 2017; JOSHI et al., 2016b; MONTIEL et al., 2016; VANNUCCI et al., 2015) podem ser usados para a quantificação viral e para a amplificação do genoma completo do agente, respectivamente.

As técnicas moleculares são rápidas, específicas e sensíveis, e podem ser utilizadas a partir de diferentes amostras biológicas. Porém, algumas dessas técnicas, como a RT-qPCR e o NGS, são de alto custo e exigem equipamentos e pessoal especializado para sua execução.

1.4.6.2 Diagnóstico sorológico

Quando se trata de diagnóstico de doenças infecciosas, a OIE recomenda que sempre haja pelo menos um teste relacionado à detecção de anticorpos, devido à sua praticidade, facilidade de coleta das amostras, baixo custo e rapidez. Os testes sorológicos são de extrema utilidade no processamento de grande número de amostras, em estudos epidemiológicos, em programas de diagnósticos em massa e na vigilância epidemiológica. Os testes sorológicos são também os mais recomendados pela OIE para a comercialização de animais, tanto no mercado interno quanto para a importação e exportação (OIE, 2014).

As técnicas sorológicas de diagnóstico para SVA já descritas incluem o ELISA (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; YANG et al., 2012), ELISA competitivo (GOOLIA et al., 2017; YANG et al., 2012), IFI (GOOLIA et al., 2017; GUO et al., 2016; JOSHI et al.,

2016b; MONTIEL et al., 2016; YANG et al., 2012) e a VN (GOOLIA et al., 2017; JOSHI et al., 2016b; KNOWLES et al., 2006; YANG et al., 2012).

Métodos sorológicos como ELISA indireto e IFI, quando realizados com a adsorção do antígeno diretamente sobre um suporte sólido (placa ou lâmina), podem apresentar ruído no sinal, conhecido como *background*. Para reduzir o ruído, esses métodos podem ser realizados com a adsorção de anticorpos, policlonais hiperimunes ou até mesmo monoclonais, utilizados para a captura do antígeno (OIE, 2014). Paralelamente, a utilização em fase sólida de proteínas recombinantes purificadas em substituição ao antígeno bruto também é uma forma de reduzir o ruído do sinal. Após a padronização de todas as etapas essas metodologias tornam-se de fácil realização, baixo custo e alguns, como os ensaios imunoenzimáticos, podem ser automatizados reduzindo a possibilidade de erros de manipulação (FLORES; CARGNELUTTI, 2012).

A técnica de VN, embora dependa de sistemas biológicos como cultivo celular, que podem apresentar variações inerentes aos processos biológicos, quando adequadamente padronizada quanto à linhagem celular, cepa viral, meio de cultura e pessoal técnico treinado para a sua realização e, principalmente, interpretação, apresenta excelente relação sensibilidade/especificidade (FLORES; CARGNELUTTI, 2012; STORCH, 2007).

A VN é a técnica que mais se assemelha ao processo natural do sistema imune em reconhecer e neutralizar antígenos exógenos em organismos superiores (FLORES; CARGNELUTTI, 2012). Por meio da utilização de títulos virais conhecidos e diluições sucessivas do soro a ser avaliado é possível obter o título de anticorpos presentes no soro capaz de neutralizar o efeito citopático induzido por um vírus em um sistema biológico celular (STORCH, 2007). Outro aspecto de extrema importância no emprego da técnica de VN para a avaliação tanto da presença quanto, principalmente, da quantificação de anticorpos específicos contra um determinado antígeno viral é que, por identificar anticorpos neutralizantes, essa técnica mimetiza o sistema imune do indivíduo ou do animal (FLORES; CARGNELUTTI, 2012). Por meio de titulação a VN também apresenta a vantagem adicional de identificar variações em epítomos de antígenos que induzem anticorpos neutralizantes, possibilitando caracterizar as variações antigênicas.

1.4.7 Considerações Finais

Senecavirus A é um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira e pouco se conhece sobre as suas propriedades biológicas e sobre a sua epidemiologia. Assim, estudos adicionais sobre a infecção por esse vírus, são necessários para elucidar aspectos importantes da fisiopatogenia da infecção, bem como conhecer o perfil imunológico e sorológico dos rebanhos em relação ao agente, e assim propor medidas efetivas de controle e profilaxia da doença.

REFERÊNCIAS

- ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da Suinocultura Brasileira**. 2016. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/attachments/-01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2017.
- ALEXANDERSEN, S.; QUAN, M.; MURPHY, C.; KNIGHT, J.; ZHANG, Z. Studies of quantitative parameters of virus Excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. **Journal of Comparative Phatology**, London, v. 129, n. 4, p. 268-282, 2003.
- 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 and Production**, v. 12, p. 192-196, 2004.
- BRACHT, A. J; O'HEARN, E. S.; FABIAN, A. W.; BARRETTE, R. W.; 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. **Suínos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- CANNING, P.; CANON, A.; BATES, J. L.; GERARDY, K.; LINHARES, D. C. L.; PIÑEYRO, P. E.; SCHWARTZ, K. J.; YOON, K. J.; RADEMACHER, C. J.; HOLTkamp, D.; KARRIKER, L. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a U.S. sow farm. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, p. 373-378, 2016.
- CARDETI, G.; MARIANO, V.; ELENI, C.; ALOISI, M.; GRIFONI, G.; SITINIERI, S. Encephalomyocarditis virus infection in *Macaca sylvanus* and *Hystrix cristata* from an Italian rescue centre for wild and exotic animals. **Virology Journal**, 2016. doi:10.1186/s12985-016-0653-9.
- CHEN, Z.; YUAN, F.; LI, Y.; SHANG, P.; SCHOROEDER, R.; LECHTENBERG, K.; HENNINGSON, J.; HAUSE B.; BAI, J.; ROWLAND, R. R. R.; CLAVIJO, A.; FANG, Y. Construction and characterization of full-length cDNA infectious clone of emerging porcine *Senecavirus A*. **Virology**, v.497, p. 111-124, 2016.
- CAROCCI, M.; BAKKALI-KASSIMI, L. The encephalomyocarditis virus. **Virulence**, v. 3, p. 351-367, 2012.
- DONIN, D. G.; LEME, R. A.; ALFIERI, A. F.; ALBERTON, G. C.; ALFIERI, A. A. First report of *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) in pig herds of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 523-528, 2014.
- FLORES, Eduardo F; CARGNELUTTI, Juliana F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, Eduardo F. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: editoraufsm, 2012. p. 327-358.
- FOWLER, V. L.; RANSBURGH, R. H.; POULSEN, E. G.; WADSWORTH, J.; KING, D. P.; MIOULET, V.; KNOWLES, N. J.; WILLIAMSON, S.; LIU, X.; ANDERSON,

G. A.; FANG, Y.; BAI, J. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus associated with emerging cases of vesicular disease in pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 239, p. 34-37, 2017.

GIBBS, E. P. J.; STODDARD, H. L.; YEDLOUTCHNIG, R. J.; HOUSE, J. A., LEGGE, M. A vesicular disease of pigs in Florida of unknown etiology. **Florida Veterinary Journal**, v. 12, p. 25-27, 1983.

GIMENEZ-LIROLA, L. G.; RADEMACHER, C.; LINHARES, D.; HARMON, K., ROTOLO, M.; SUN, Y.; BAUM, D. H.; ZIMMERMAN, J.; PIÑEYRO, P. Serological and molecular detection of Senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 2082-2089, 2016.

GOOLIA, M.; VANUCCI, F.; YANG, M.; PATNAYAK, D.; BABIUK, S.; NFON, C. K. Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to *Senecavirus A* in swine sera, 2017. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2017. doi: 10.1177/1040638716683214.

GUO, B.; PIÑEYRO, P. E.; RADEMACHER, C. J.; ZHENG, Y.; LI, G.; YUAN, J.; HOANG, H.; GAUGER, P. C.; MADSON, D. M.; SCHWARTZ, K. J.; CANNING, P. E.; ARRUDA, B. L.; COOPER, V. L.; BAUM, D. H.; LINHARES, D. C.; MAIN, R. G.; YOON, K.-J. Novel Senecavirus A in swine with vesicular disease, United States, July 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1325-1327, 2016.

HALES, L.M.; KNOWLES, N.J.; REDDY, P.S.; XU, L.; HAY, C.; 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. **Virus taxonomy**: 2015 release. 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

ISID. International Society for Infectious Diseases. **Vesicular disease, porcine UK (N. Ireland)**: not FMD, SVD. ProMED-mail. Archive Number: 20070110.0099. Disponível em: <<http://www.promedmail.org/direct.php?id=6471>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

ISID. International Society for Infectious Diseases. **Senecavirus A Canada: (Ontario) swine**, 2016. ProMED-mail. Archive Number: 20161009.4546471. Disponível em: <<http://www.promedmail.org/direct.php?id=20161009.4546471>> Acesso em: 08 fev. 2017.

JOSHI, L. R.; DIEHL, D. G. Senecavirus A: a newly emerging picornavirus of swine. **EC Microbiology**, v. 2.4, p. 363-364, 2015.

JOSHI, L. R.; MOHR, K. A.; CLEMENT, T.; HAIN, K. S.; MYERS, B.; YAROS, J.; NELSON, E. A.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; GAVA, D.; SCHAEFER, R.; CARON, L.; DEE, S.; DIEHL, D. G. Detection of the emerging Senecavirus A in pigs, mice and houseflies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 1536-1545, 2016a.

JOSHI, L. R.; FERNANDES, M. H. V.; CLEMENT, T.; LAWSON, S.; PILLATZKI, A.; RESENDE, T. P.; VANUCCI, F.; KUTISH, G. F.; NELSON, E. A.; DIEHL, D. G.

Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 3267-3279, 2016b.

KNOWLES, N. J.; 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. In: 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.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; GASPARINI, M. R.; SALES, E. B.; RIVETTI, A. V.; SOUSA, N. M.; OLIVEIRA, A. M.; CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA, T. F. P.; GONÇALVES, J. P. M.; MADUREIRA, M. C.; RIBEIRO, D. P.; MARCONDES, I. V.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; FONSECA JR, A. A. Molecular epidemiology of Senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 216, p. 207-209, 2016.

LEME, R. A.; ZOTTI, E.; ALCANTARA, B. K.; OLIVEIRA, M. V.; FREITAS, L. A.; ALFIERI, A. F.; 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.; ALFIERI, A. A. Clinical manifestations associated with Senecavirus A in neonatal piglets. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p. 1238-1241, 2016a.

LEME, R. A.; OLIVEIRA, T. E. S.; ALFIERI, A. F.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, p. 145-155, 2016b.

MONTGOMERY, J. F.; OLIVER, R. E.; POOLE, W. S. A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease I. Field cases. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 35, p. 21-26, 1987.

MONTIEL, N.; BUCKLEY, A.; GUO, B.; KULSHRESHTHA, V.; VANGEELLEN, A.; HOANG, H.; RADEMACHER, C.; YOON, K-J., LAGER, K. Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with Senecavirus A. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1246-1248, 2016.

MUNDAY, B. L.; RYAN, F. B. Vesicular lesions in swine - possible association with the feeding of murine products. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 193, 1982.

OIE. Animal Health in the World. **Disease cards swine vesicular disease**. 2013.

Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SWINE_VESICULAR_DISEASE.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

OIE. Animal Health in the World. Development and optimization of antibody detection assays. In: _____. **OIE validation recommendations**. Paris, 2014. p. 1-13.

OIE. Animal Health in the World. **Country information 2016**. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/animalsituation>. Acesso em: 12 jan. 2017.

OIE. Animal Health in the World – **Disease cards foot and mouth disease**. 2017a. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/FMD-EN.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

OIE. Animal Health in the World – **Official status**. 2017b. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/official-disease-status/>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

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

QIAN, S.; FAN, W.; QIAN, P.; CHEN, H.; LI, X. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016. **Virology Journal**, v. 13, p. 173, 2016.

REED, P. S.; BURROUGHS, K. D.; HALES, L. M.; GANESH, S.; JONES, B. H.; IDAMAKANTI, N.; HAY, C.; LI S. S.; SKELE, K. L.; VASKO, A. J.; YANG, J.; WATKINS, D. N.; RUDIN, C. M.; HALLENBECK, P. L. Seneca Valley virus, a systematically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. **Journal of National Cancer Institute**, v. 99, p. 1623-1633, 2007.

RIBEIRO, J.; LEME, R. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. High frequency of Aichivirus C (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 1757-1762, 2013.

SEGALÉS, J.; BARCELLOS, D.; ALFIERI, A. A.; BURROUGH, E.; MARTHALER, D. Senecavirus A: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs? **Veterinary Pathology**, v. 54, p. 11-21, 2017.

SENSI, M.; CATALANO, A.; TINARO, M.; MARIOTTI, C.; PANZIERI, C.; MARCHI, S.; COSTARELLI, S. 2010. Idiopathic vesicular disease (IVD): a case report in the centre of Italy. **21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress**; July 18-21; Vancouver, Canada: International Pig Veterinary Society; p. 46.

SINGH, K.; CORNER, S.; CLARK, S. G.; SCHERBA, G.; 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.

STORCH, A. Gregory. Diagnostic Virology. In: KNIFE, David M; HOWLEY Peter M; GRIFFIN, Dianne E; LAMB, Robert A; MARTIN, Malcolm A; ROIZMAN, Bernard; STRAUS, Stephen E. **Fields**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 565-604.

VANNUCCI, F.A.; LINHARES, D.C.; BARCELLOS, D.E.; LAM, H.C.; COLLINS, J.; 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.

VENKATARAMAN, S.; REDDY, S. P.; LOO, J.; IDAMAKANTI, N.; HALLENBECK, P. L.; REDDY, V. S. Structure of Seneca Valley virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus. **Structure**, v. 16, p. 1555-1561, 2008.

WANG, L.; PRARAT, M.; HAYES, J.; ZHANG, Y. Detection and Genomic Characterization of Senecavirus A, Ohio, USA, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1321-1323, 2016.

WILLCOCKS, M. M.; LOCKER, N.; GOMWALK, Z.; ROYALL, E.; BAKHSHESH, M.; BELSHAM, G. J.; IDAMAKANTI, N.; BURROUGHS, K. D.; REDDY, P. S.; HALLENBECK, P. L.; ROBERTS, L. O. Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES. **Journal of Virology**, v. 85, p. 4452-4461, 2011.

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

WU, Q.; ZHAO, X.; BAI, Y.; SUN, B.; XIE, Q.; MA, J. The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2016b. doi:10.1111/tbed.12557

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

YU, J. M.; LI, X. Y.; AO, Y. Y.; LI, L. L.; LIU, N.; LI, J. S.; DUAN, Z. J. Identification of a novel picornavirus in healthy piglets and seroepidemiological evidence of its presence in humans. **PLoS One**, v. 8, p. e70137, 2013.

ZHANG, J.; PINEYRO, P.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; LI, G.; RADEMACHER, C.; DERSCHEID, R.; GUO, B.; YOON, K. J.; MADSON, D.; GAUGER, P.; SCHWARTZ, K.; HARMON, K.; LINHARES, D.; MAIN, R. Full-length genome sequences of Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U.S. swine. **Genome Announcements**, v. 3, 2015.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar retrospectivamente, por meio de teste sorológico, a presença da infecção pelo *Senecavirus A* em rebanhos suínos brasileiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de vírus neutralização para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-*Senecavirus A* (SVA) em soro de suínos.
- Investigar a presença de anticorpos anti-SVA em amostras de soro de suínos obtidas antes e após os surtos de doença vesicular associada à infecção pelo vírus no Brasil, de animais de diferentes categorias de produção oriundos de granjas com e sem histórico clínico da doença e provenientes de diferentes regiões geográficas brasileiras.
- Avaliar a resposta imunológica à infecção pelo SVA.
- Comparar os títulos de anticorpos neutralizantes anti-SVA em amostras de soro obtidas antes e após o início dos surtos da doença no Brasil.
- Estabelecer o provável período (ano) de introdução do SVA em rebanhos suínos brasileiros.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

A TEN YEARS (2007-2016) RETROSPECTIVE SEROLOGICAL SURVEY FOR
SENECAVIRUS A INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS*

* Artigo no formato do periódico *Veterinary Research Communications*.
(<https://link.springer.com/journal/11259>) (ANEXO E)

**A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for *Senecavirus A*
infection in Brazilian pig herds**

Abstract

Senecavirus A (SVA) is the etiological agent of vesicular disease in pigs, clinically indistinguishable of classical viral vesicular infections, including foot-and-mouth disease. The first outbreaks of SVA infection in Brazil were reported in 2014. However, it was not known whether the virus was circulating in Brazilian pig herds before this year. The aim of this study is the retrospective serological investigation of porcine SVA health status in Brazil. Serum samples ($n = 505$) were grouped in before (2007-2013, $n = 258$) and after (2014-2016, $n = 247$) SVA outbreaks in Brazil. Twelve pig herds were analyzed, of which 8 and 4 were sampled before and after the beginning of SVA Brazilian outbreaks, respectively. Two herds sampled after 2014 presented animals with SVA-associated clinical manifestations, while the other two housed asymptomatic pigs. SVA antibodies were evaluated by virus neutralization test. The results demonstrated that pig herds of different Brazilian geographical regions and distinct pig categories were negative to anti-SVA antibodies in sera obtained before 2014. Antibodies to SVA were detected only in serum samples obtained after 2014, particularly in herds with the presence of pigs with SVA-clinical signs. These results present robust serological evidence that the SVA was not present in the Brazilian pig herds prior to 2014.

Key words: epidemiology, picornavirus disease, Seneca Valley virus, swine vesicular infection, virus neutralization test.

Introduction

Senecavirus A (SVA) is the single representative species within the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family (ICTV 2015). This is a small, non-enveloped, single-stranded, positive sense RNA virus, which was discovered in 2002 as a cell culture contaminant (Knowles et al. 2006).

Since 2008 studies have reported porcine idiopathic vesicular disease (PIVD) in animals from Canada and the United States (USA) (Pasma et al. 2008; Singh et al. 2012). In both studies SVA was considered to be the causative agent of the vesicular disease. The infection clinical signs consist in vesicles and erosions on the skin, snout, oral cavity, and coronary bands, which are clinically indistinguishable of the classical viral vesicular diseases, such as foot-and-mouth disease (FMD), swine vesicular disease (SVD), vesicular stomatitis (VS), and vesicular exanthema of swine (VES) (Pasma et al. 2008; Singh et al. 2012).

The first SVA outbreak reported outside of North America was in Brazil, 2014 (Leme et al. 2015a; Leme et al. 2015b; Vannucci et al. 2015). In these cases, the virus infection was associated with vesicular lesions on the coronary bands, hooves, and/or snouts in weaning and adult pigs (Leme et al. 2015b; Vannucci et al. 2015) and with high mortality rates in piglets at 1 to 5 days old (Leme et al. 2015a; Leme et al. 2016a; Leme et al. 2016b). In 2015, in China, SVA was detected in pigs with vesicular disease and in newborn piglets with sudden death (Wu et al. 2016). At the same year, novel outbreaks of SVA infection in pigs at different ages, including neonatal pigs, were reported in the USA (Canning et al. 2016; Gimenez-Lirola et al. 2016).

Retrospective and prospective studies to infectious disease investigations are important to outline the serological profile of livestock, and represent important tools for the establishment of the time of entrance of an infectious agent in a country, as well as

for determining the risk factors associated with the infection. Serological studies conducted in Switzerland and Denmark were relevant to collect data on porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRSV) infection (Corbellini et al. 2006; Antunes et al. 2015); serological analyses were also used in the USA to monitor and for surveillance of porcine epidemic diarrhea (PED) (Fan et al. 2015; Okda et al. 2015).

Considering that until the second half of 2014 there were no reports, and even clinical evidence of the SVA infection in Brazilian pig herds, this study aimed to retrospectively investigate the presence of anti-SVA antibodies in swine of this country.

Materials and methods

Inclusion criteria for serum samples

Samples included in this study are part of a bank of swine sera sent to the Laboratory of Animal Virology from State University of Londrina for the serological profile evaluation of asymptomatic animals newly vaccinated against some infectious diseases. Additionally, pig serum samples that were submitted to the laboratory by consulting veterinarians for diagnosis purposes also were included. Individual aliquots of the serum samples were properly labeled, sealed, and stored at -80°C until used for analyses.

The inclusion criteria used for selection of serum samples were the serum collection date (year), diversity of geographical origin of pig herds, and age (categories) of the pigs. Serum samples ($n = 505$) obtained before and after 2014 from four different states of the Southern and Southeast Brazilian regions were included in the survey. Animals were of different categories, including suckling (≤ 3 weeks old), nursery (4-8 weeks old), and finishing (≥ 9 weeks old) pigs. Inclusion criteria for serum samples collected after the year 2014 also included the health status of the pig herd as samples

obtained from herds with and without history of clinical signs consistent with the SVA infection. A total of 505 pig serum samples were selected for analysis of the presence of anti-SVA neutralizing antibodies. Table 1 shows the distribution of the serum samples according to the collection period (before and after 2014), the geographical origin and health status of the pig herds, and the animal categories. Additionally, 14 to 22 days before the sera collection in the two herds with clinical history of SVA-associated disease, vesicular fluid from adult pigs in both herds and a neonatal piglet that spontaneously died soon after birth were collected for the virus investigation by RT-PCR assay, as previously described (Leme et al. 2015b).

Table 1. Sera collection data according to the period (year), state of origin, and number of herds and samples for different pig categories, Brazil, 2007-2016.

Collection date	State of origin ^a	Clinical signs ^b	Number of Pigs according to categories			TOTAL	
			Herds ^c				
				Suckling	Nursery		Finishing
2007 - 2013	PR	A	6	20	30	80	130
	SC	A	1	20	0	20	40
	SP	A	1	30	20	38	88
Subtotal			8	70	50	138	258
2014 - 2016	MG	A	1	0	0	50	50
	SP	A	1	0	0	60	60
	SC	P	2	0	0	137	137
Subtotal			4			247	247
TOTAL	4		12	70	50	385	505

^aPR = Paraná; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo; MG = Minas Gerais.

^bA = Absence; P = Presence.

^cDifferent herds within the same state.

Virus neutralization test

The virus neutralization (VN) test was performed with the SVA strain BRA/UEL-PR/15 (GenBank accession number KX712388). This SVA Brazilian wild-type strain was isolated in porcine kidney (PK-15) cells from a tissue fragment of spleen of a 3-day-old piglet that presented diarrhea, neurological signs, and spontaneous death (Leme et al. 2016a), as previously described (Leme et al. 2015b). The 50% endpoint was determined according to the method of Reed and Muench (1938).

The VN assay was performed in 96 well plates. The tested sera were heat-inactivated at 56°C/30 min and then 2-fold serially diluted up to 1:4,096. Sera were incubated with 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) of the SVA BRA/UEL-PR/15 strain at 37°C/1 h in a 5% CO₂ incubator (Thermo Electron Corporations®, Marietta, OH, USA). Following, 1×10^5 PK-15 cells were added in each well. For the toxicity evaluation, individual aliquots of each serum sample were tested without addition of the virus. The citopathic effect (CPE) was evaluated 72 h after inoculation. The neutralizing titer was considered the reciprocal of the highest dilution of serum capable of preventing 100% of the CPE production. The serum samples with neutralizing antibody titer ≥ 64 were regarded as positive result (Yang et al. 2012; Goolia et al. 2017). All the sera in this survey were tested in triplicates, regardless of their antibody titers.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Epi InfoTM, using Chi-square (χ^2) or Fisher exact tests to compare the proportions of serum samples positive and negative for anti-SVA antibodies. The confidence limit for the statistical tests was set at 95% ($p < 0.05$).

Results

All the serum samples that were collected between 2007 and 2013 presented antibody neutralizing titers < 64 and were considered as negative in the VN test. For the serum samples collected between 2014 and 2016, the results were consistent with the clinical history of the herds. The 110 sera originated from asymptomatic pigs of non-affected pig herds located in São Paulo and Minas Gerais states had similar results of the herds sampled before the outbreaks, with low (< 64) titers of neutralizing antibodies. Conversely, 65.7% (90/137) of porcine sera derived from clinically affected-herds presented positive (≥ 64) results (Table 2).

Table 2. *Senecavirus A* virus neutralization test results in porcine serum distributed in each period (year) according to the herds and serum samples evaluated, Brazil, 2007-2016.

Collection date	Herd clinical signs	Virus neutralization results					
		Herds ($n = 12$)			Serum samples ($n = 505$)		
		Total	Positive	Negative	Total	Positive (%)	Negative (%)
2007 - 2013	A	8	0/8	8/8	258	0 (0)	258 (100)
2014 - 2016	A	2	0/2	2/2	110	0 (0)	110 (100)
	P	2	2/2	0/2	137	90 (65.7) ^a	47 (34.3) ^b

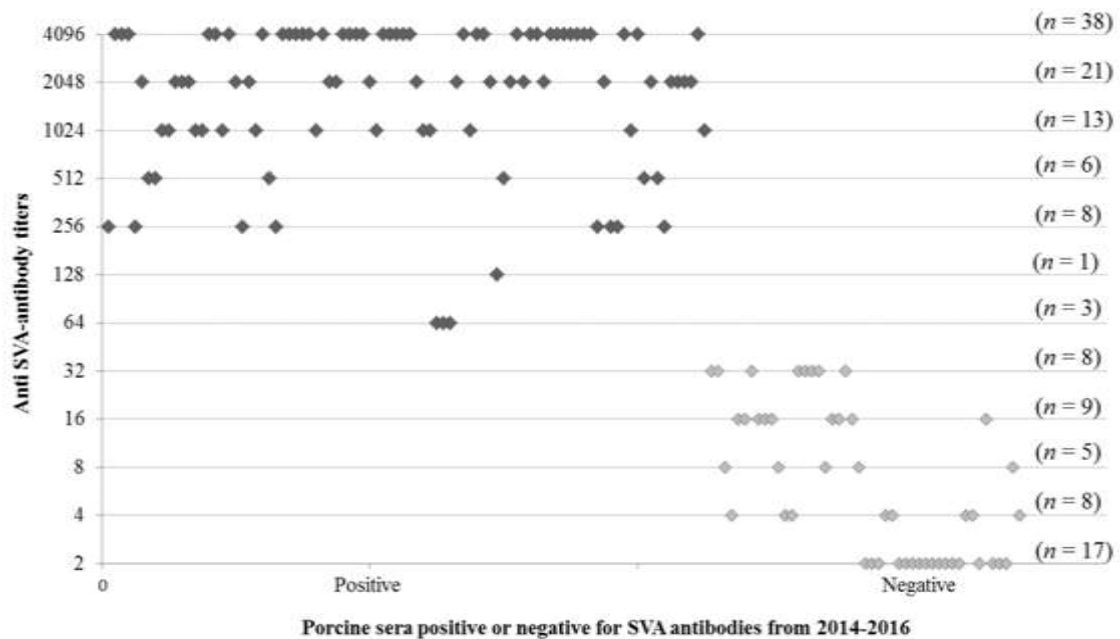
A = Absence; P = Presence.

^{a,b} Statistically significant difference ($p < 0.05$).

Among pigs derived from clinically-affected herds, the anti-SVA antibody titers reached $\geq 4,096$ for 38 of 90 positive serum samples. The Fig. 1 presents the anti-SVA antibody titers among the 137 serum samples of clinically-affected herds. The RT-PCR assay from vesicular fluid and piglet tissue samples that were collected during the peak

of SVA-induced infection, which was 14 to 22 days before the serum collection date presented positive results for SVA RNA.

Fig. 1. Virus neutralization results from pig herds with SVA-associated clinical signs.



Discussion

This is the first serological survey intended for the retrospective investigation of SVA circulation in Brazil. Serum samples included in this study were derived from the Brazilian states with the important pork production. In 2015, the states of Santa Catarina, Paraná, São Paulo, and Minas Gerais were responsible for 65% of the Brazilian pig production (ABPA 2016).

A twenty-year retrospective study conducted in the USA revealed that SVA has circulating in that country since 1988 (Hales et al. 2008). Although other studies reported a possible association of SVA with porcine vesicular disease in the USA (Pasma et al. 2008; Singh et al. 2012), in most of the cases likely there was silent virus infection.

In Brazil, the first reports of SVA-associated disease were in late 2014 and early 2015 (Leme et al. 2015a; Leme et al. 2015b; Vannucci et al. 2015). However, it was not known whether the virus was circulating in Brazil before this period.

The VN results from this study revealed that the animals that were sampled before 2014 had no contact with the virus, suggesting that SVA likely was not circulating in Brazil before that year. On the contrary, most ($n = 90$) of the porcine sera collected during and/or after 2014 from clinically affected-pig herds presented high titers of anti-SVA neutralizing antibodies, indicating the animal were exposed to the virus. This statement is supported by the results from the RT-PCR assay, which was able to detect the virus RNA from samples of adult and neonatal pigs obtained at the moment of clinical manifestation peak in both herds with consistent clinical history of SVA-induced disease.

Sera collected within this same period and assumed as negative ($n = 47$) for anti-SVA antibodies were derived from asymptomatic pigs, reflecting their health status at the moment of the sample collection. SVA-based experimental studies revealed an early immunological response against the virus (Joshi et al. 2016; Montiel et al. 2016), with anti-SVA neutralizing antibodies being detected at 5 days post-inoculation (Joshi et al. 2016). Therefore, in this study it is possible that some of the seronegative pigs derived from herds with symptomatic animals were at early incubation period of the virus infection.

Thirty-eight serum samples analyzed in this study showed high ($\geq 4,096$) anti-SVA antibody titers. We speculate that if continual dilutions have been performed higher antibody titers would be detected in some of these samples. This result suggests that SVA infection is highly immunogenic. Another study detected anti-SVA antibodies in sows up to 180 days after clinical manifestation peak in a SVA outbreak (Goolia et al. 2017). The prolonged detection of antibodies against SVA (Goolia et al. 2017) and the high antibody

titers detected in this and other studies (Guo et al. 2016; Joshi et al. 2016; Montiel et al. 2016) reinforce the SVA immunogenic feature and suggest that the immunological response against the SVA infection is long lasting. However, this hypothesis should be taken with caution, since it is also likely that high titers of anti-SVA neutralizing antibody titers in naturally infected animals may be due to the SVA circulation within the pig herd, leading to the constant virus exposure of the animals and consequently to immunological booster.

Since July, 2015 an increased number of SVA outbreaks has been reported in the USA (Joshi et al. 2016). In the same year the virus was first reported outside of the American continent, in China (Wu et al. 2016). In all of these cases, SVA infection was associated with important clinical manifestations, including vesicular disease in different categories of pig production. Therefore, it is important to determine the SVA immunological/serological status of pig herds especially in the major pig producing countries, since SVA-associated vesicular disease in pigs is clinically indistinguishable from classical vesicular diseases, especially FMD. It is important to note that the emergence of SVA-associated vesicular disease could adversely affect prompt reporting of FMD in pigs (Fowler et al. 2017).

Conclusions

The study represents the first serological survey intended for the retrospective investigation of SVA circulation outside of a North American country. The pork industry has great economic and social importance worldwide. The Brazilian pig farming is an important agribusiness segment. At the end of 2014 we experienced the first entry of a new virus (SVA) in our pig herds demonstrating the vulnerability of the production system. The results in this study indicate that the virus was not circulating in Brazil before

2014. The occurrence of swine health emergencies can put the entire productive chain at risk. To provide timely and efficient foreign disease investigation and surveillance and the adoption of robust risk mitigation measures are actions intended for the animal health and industry protection that have to be implemented with responsibilities from both the public (official) and private (producer and processing companies) sectors. The production chain as a whole should always be united and alert to the existence and/or constant risk of entry of exotic diseases in different countries.

Acknowledgements

We thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Counsel of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., and Leme, R.A. are recipients of CNPq fellowships. Saporiti, V. is recipient of CAPES fellowship.

Conflict of Interest

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

References

- ABPA (2016) Annual report 2016. Brazilian Association of Animal Protein. http://abpa-br.com.br/storage/files/abpa_relatorio_anual_2016_ingles_web_versao_para_site_abpa_bloqueado.pdf. Accessed January 10, 2017
- Antunes AC, Halasa T, Lauritsen KT, Kristensen CS, Larsen LE, Toft N (2015) Spatial analysis and temporal trends of porcine reproductive and respiratory syndrome in

- Denmark from 2007 to 2010 based on laboratory submission data *BMC Vet Res* 11:303 doi:10.1186/s12917-015-0617-0
- Canning P et al. (2016) Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a U.S. sow farm *Transbound Emerg Dis* 63:373-378 doi:10.1111/tbed.12516
- Corbellini LG, Schwermer H, Presi P, Thur B, Stark KD, Reist M (2006) Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland *Vet Microbiol* 118:267-273 doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.018
- Fan JH, Zuo YZ, Shen XQ, Gu WY, Di JM (2015) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the monitoring and surveillance of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant membrane protein *J Virol Methods* 225:90-94 doi:10.1016/j.jviromet.2015.07.021
- Fowler VL et al. (2017) 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* 239:34-37 doi:10.1016/j.jviromet.2016.10.012
- Gimenez-Lirola LG et al. (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 doi:10.1128/jcm.00710-16
- Goolia M, Vannucci F, Yang M, Patnayak D, Babiuk S, Nfon CK (2017) Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera *J Vet Diagn Invest* 10.1177/1040638716683214 doi:10.1177/1040638716683214
- Guo B et al. (2016) Novel Senecavirus A in swine with vesicular disease, United States, July 2015 *Emerg Infect Dis* 22:1325-1327 doi:10.3201/eid2207.151758

- 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 doi:10.1099/vir.0.83570-0
- ICTV (2015) Virus taxonomy: 2015 release. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Accessed October 01, 2016
- Joshi LR et al. (2016) Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs J Gen Virol 97:3267-3279 doi:10.1099/jgv.0.000631
- Knowles NJ et al. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. In: EUROPIC 2006: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saariselkä, Inari, Finland, 2006. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, p G2
- Leme RA et al. Molecular, pathological, and immunohistochemical evidence of Senecavirus A-induced infections in pigs of different age groups with vesicular disease from Brazil. In: Allen D. Leman Swine Conference, Saint Paul, Minnesota, USA, 2015a. University of Minnesota, p 26
- Leme RA, Zotti E, Alcantara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, Alfieri AA (2015b) Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds Transbound Emerg Dis 62:603-611 doi:10.1111/tbed.12430
- Leme RA, Oliveira TE, Alfieri AF, Headley SA, Alfieri AA (2016a) Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with Senecavirus A-induced lesions in neonatal piglets J Comp Pathol 155:145-155 doi:10.1016/j.jcpa.2016.06.011

- Leme RA, Oliveira TES, Alcântara BK, Headley SA, Alfieri AF, YanG M, Alfieri AA (2016b) Clinical manifestations associated with Senecavirus A in neonatal piglets Emerg Infect Dis 22:1238-1241 doi:10.3201/eid2207.151583
- Montiel N et al. (2016) Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with Senecavirus A Emerg Infect Dis 22:1246-1248 doi:10.3201/eid2207.151863
- Okda F et al. (2015) Development of an indirect ELISA, blocking ELISA, fluorescent microsphere immunoassay and fluorescent focus neutralization assay for serologic evaluation of exposure to North American strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus BMC Vet Res 11:180 doi:10.1186/s12917-015-0500-z
- Pasma T, Davidson S, Shaw SL (2008) Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba Can Vet J 49:84-85
- Reed LJ, Muench H (1938) A Simple method of estimating fifty per cent endpoints Am J Epidemiol 27:493-497 doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Singh K, CorneR S, Clark SG, Scherba G, Fredrickson R (2012) Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease J Vet Sci Technol 3:1-3
- 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 doi:10.1111/tbed.12410
- Wu Q, Zhao X, Chen Y, He X, Zhang G, Ma J (2016) Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China Genome Announc 4 doi:10.1128/genomeA.01509-15

Yang M, van Bruggen R, Xu W (2012) Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus J Vet Diagn Invest 24:42-50
doi:10.1177/1040638711426323

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- A técnica de vírus neutralização foi capaz de detectar anticorpos neutralizantes anti-*Senecavirus A* (SVA) em soro de suínos, representando uma ferramenta de diagnóstico da infecção pelo vírus especialmente para o processamento de grande número de amostras, em estudos epidemiológicos, em programas de diagnósticos em massa e na vigilância epidemiológica.
- A não detecção de anticorpos anti-SVA em amostras de soro de suínos obtidas antes de 2014 sugere que o vírus não estava presente em rebanhos suínos brasileiros até então.
- A presença de anticorpos anti-SVA em amostras de soro de suínos obtidas partir de 2014 sugere que o vírus passou a circular no Brasil a partir deste ano.
- Os altos títulos de anticorpos anti-SVA identificados em soros suínos provenientes de granjas com animais com sinais clínicos de doença vesicular sugerem que o SVA seja altamente imunogênico para essa espécie animal.

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. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
6. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
7. Água DEPC (Dietil 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. Antibiótico-antimicótico (Gibco[®])
11. Azul de bromofenol (Sigma[®])
12. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
13. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma[®])
14. Brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
15. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
16. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
17. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
18. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
19. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
20. Dimetil sulfóxido (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Sigma[®])
21. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
22. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies[™])
23. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
24. 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[™])
25. 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[™])

26. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL[®])
27. Fenol (C₆H₅OH) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
28. Fosfato de sódio dihidratado (Na₂HPO₄ . 2H₂O) P.M 177,99 (Merck[®])
29. Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ . 2H₂O) P.M. 155,99 (Reagen[®])
30. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth[®])
31. Glicose (C₆H₁₂O₆) P.M. 180,16 (Reagen[®])
32. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
33. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
34. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
35. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* SVV-2682FW (forward; 5'-TTCCACTCCACCGACAACG -3'; nucleotide (nt) 2682-2700) Leme *et al.* (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* SVV-3224RV (reverse; 5'-GATACCTTCCCACCCTTGC -3'; nucleotide (nt) 3206-3224) Leme *et al.* (2015) - 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. Soro fetal bovino (Gibco BRL[®])
41. SuperScript[™] III Reverse Transcriptase 200 units (Invitrogen Life Technologies[™])
42. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])
43. 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[™])
44. QuantIT[™] dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies[™])
45. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
46. Triton x-100
47. Vermelho de fenol (C₁₉H₁₄O₅S) 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/ μ L): ressuspender em 205,5 μ L de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/ μ L): 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/ μ L): ressuspender em 153,5 μ L de água MilliQ autoclavada para obtenção de solução 10x []

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

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque (100 mM) – 100 μ L de cada dNTP
- solução uso (10 mM) – 10 μ L da solução estoque + 90 μ L de água 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 μ L 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
- **Solução Salina de Saint Groth**
 - 8 g de Cloreto de sódio (NaCl)
 - 0,4 g Cloreto de potássio (KCl)
 - 1,77 g Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)
 - 0,69 g Fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄)
 - 2 g Glicose
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1 L
 - pH 7,2
- **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 (Na_2HPO_4)
- 15 mM Potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4)
- 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

- **Isolamento do *Senecavirus A***

1. Células

- Preparar células PK-15 em garrafas (25 mL) 24 h antes da inoculação do material (inóculo).
- Sempre preparar garrafas extras para utilizar como controles.

2. Preparo do material a ser inoculado (inóculo)

Líquido de vesícula

- 100 µL de líquido de vesícula
- 500 µL de meio DMEM (sem SFB)
- Vortexar
- Centrifugar a 1000 *rpm* (baixa rotação) / 5 min
- 500 µL do sobrenadante + 500 µL de DMEM (sem SFB) + 50 µL de Anti-Anti 100X (antibiótico e antifúngico - Gibco®)
- Utilizar 1000 µL para inoculação

Suspensão de tecido

- 1,5 g do fragmento de órgão
- 1000 µL de meio DMEM (sem SFB)
- Macerar
- Vortexar
- Centrifugar a 1000 *rpm* (baixa rotação) / 10 min
- 500 µL do sobrenadante + 500 µL de DMEM (sem SFB) + 50 µL de Anti-Anti 100X (antibiótico e antifúngico - Gibco®)
- Utilizar 1000 µL do sobrenadante para inoculação.

3. Adsorção

- 1000 µL do material previamente preparado (líquido de vesícula ou tecido)
- Remover meio das garrafas com células

- Lavar garrafa 3X com solução salina de Saint Groth
- Adicionar 1000 μL do inóculo em garrafa estacionária contendo monocamada de cultivo de célula PK-15
- Incubar em agitação em estufa a $37^{\circ}\text{C}/3\text{h}$ em atmosfera de 5% de CO_2
- Lavar garrafa 3X com solução salina de Saint Groth
- Adicionar 10 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 10% de Anti-Anti (*Gibco*®)
- Incubar em estufa a 5% de CO_2 e monitorar diariamente quanto a presença de ECP.
- Caso não ocorra ECP, incubar até 7 dias, congelar a -80°C , descongelar e fazer novas passagens.
- Para fazer “passagens cegas”, caso não tenha ocorrido ECP, as garrafas devem ser congeladas a -80°C , descongeladas a 37°C , e utilizar 1 mL do sobrenadante para inocular outras garrafas com cultivos celulares de PK-15 de 24 h.

- **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)
<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-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 (°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

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

- **Virus neutralização para o *Senecavirus A* (SVA)**

- Inativar os soros a serem testados a $56^{\circ}\text{C}/30$ min
- Distribuir 50 μL de meio DMEM (sem SFB) em cada cavidade de placas de 96 cavidades
- Distribuir em triplicata, na primeira cavidade de cada coluna, 50 μL dos soros a serem avaliados
- Em uma placa a parte, também com 50 μL de meio DMEM, distribuir 50 μL de amostra de cada soro, com o objetivo de realizar o teste de toxicidade
- Diluir serialmente os soros homogeneizando 5X em cada diluição
- Adicionar o volume de 50 μL contendo 100 TCID_{50%} do SVA em cada cavidade, não adicionar o vírus na placa de teste de toxicidade

- Incubar as placas em estufa a 37°C/1 h em atmosfera com 5% de CO₂
- Adicionar 50 µL da suspensão de célula PK-15 na concentração de 1 X 10⁵ em cada cavidade, inclusive na placa de teste de toxicidade (suspensão diluída em meio DMEM com 10% de SFB)
- Incubar as placas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂
- Monitorar as placas diariamente quanto à presença de ECP
- Leitura final após 72 h de incubação.

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>)

ANEXO E: Formato do Periódico

Formato de Artigo do Periódico *Veterinary Research Communications*

(<https://link.springer.com/journal/11259>)

- Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

- Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

- Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

- Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

- Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

- Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

- Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)
- Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

- Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

- Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

- Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

- Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

- Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article
- Article by DOI
- Book
- Book chapter
- Online document
- Dissertation
- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.
- Electronic Figure Submission
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.

- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Line Art
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Halftone Art
- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Combination Art
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
- Color Art
- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).
- Figure Lettering
- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.
- Figure Numbering
- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.
- Figure Captions
- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.
- Figure Placement and Size
- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.