



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL DE ARRUDA LEME

***SENECAVIRUS A:***  
VIROSE VESICULAR EMERGENTE NA SUINOCULTURA  
BRASILEIRA

---

Londrina  
2017

RAQUEL DE ARRUDA LEME

***SENECAVIRUS A:***  
VIROSE VESICULAR EMERGENTE NA SUINOCULTURA  
BRASILEIRA

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

**Orientador:** Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina  
2017

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

Leme, Raquel de Arruda.

SENECAVIRUS A: VIROSE VESICULAR EMERGENTE NA SUINOCULTURA BRASILEIRA / Raquel de Arruda Leme. - Londrina, 2017.  
165 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

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

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

RAQUEL DE ARRUDA LEME

***SENECAVIRUS A:***

**VIROSE VESICULAR EMERGENTE NA SUINOCULTURA BRASILEIRA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula F. L. Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Takiuchi  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Prof. Dr. Márcio Costa  
Department of Veterinary Biomedicine  
University of Montreal - UofM

Londrina, 17 de Fevereiro de 2017.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal (LabVir), no Laboratório Multiusuário em Saúde Animal (LAMSA) - Unidade de Biologia Molecular e no Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

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

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

## **DEDICO**

---

Ao meu esposo, Ricardo,  
e filhos, Luiza e João Pedro.

Aos meus pais,  
Luiz Carlos e Mari Angela,  
e irmãs, Cristina e Izabel.

## AGRADECIMENTOS

---

### AGRADECIMENTOS

A Deus sempre!

Aos professores Alice e Amauri Alfieri, pela orientação permanente, pelos ensinamentos e experiências compartilhados, pelas perspectivas geradas. Vocês sempre terão minha admiração e respeito!

Aos professores que constituíram a banca de qualificação, Dr.<sup>a</sup> Ana Angelita Sampaio Baptista, Dr.<sup>a</sup> Lucienne Garcia Pretto Giordano e Dr. Selwyn Arlington Headley, obrigada pelo seu tempo, assistência e orientações.

Expresso aqui o meu carinho e respeito especiais à Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, com quem tive a oportunidade de assistir aulas e interagir... Obrigada pela formação acadêmica e científica.

À secretária Helenice e aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, do Laboratório de Patologia Animal, do Laboratório de Virologia Animal e da Unidade de Biologia Molecular do Laboratório Multiusuário de Saúde Animal.

À Dr.<sup>a</sup> Ming Yang, do *National Centre for Foreign Animal Disease*, Winnipeg, Manitoba, Canadá, por contribuir de maneira valiosa com as nossas pesquisas.

Aos colegas veterinários que trabalham a campo, em especial ao César Feronato, Dalmo Martins Leturiondo, Everson Zotti, Marcelo Dacas, Marcelo Felipe Güths, Yuso Henrique Tutida, e aos colegas e amigos de laboratório que sempre, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Como sempre, sou grata pelo amor e apoio que recebo tão generosamente da minha família. Aos meus pais, que continuam me apoiando e acreditando em mim. Às minhas irmãs, que não perdem os hábitos de cercar, cuidar, compartilhar, acompanhar, rir, chorar, lamentar, escutar, temer, acreditar, incentivar, agradecer!

Sou especialmente grata aos meus filhos e ao meu esposo que foram excepcionalmente pacientes e cujo encorajamento foi primordial para o meu sucesso.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

*Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:  
Tempo para nascer, e tempo para morrer;  
tempo para plantar, tempo para arrancar o que foi plantado;  
Tempo para matar, e tempo para sarar; tempo para demolir, e tempo para construir;  
Tempo para chorar, e tempo para rir; tempo para gemer, e tempo para dançar;  
Tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;  
tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se;  
Tempo para procurar, e tempo para perder;  
tempo para guardar, e tempo para jogar fora;  
Tempo para rasgar, e tempo para costurar; tempo para calar, e tempo para falar;  
Tempo para amar, e tempo para odiar; tempo para a guerra, e tempo para a paz.*

## RESUMO

LEME, Raquel Arruda. *Senecavirus A: virose vesicular emergente na suinocultura brasileira*. 2017. 165f. Tese (Doutorado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

### RESUMO

As doenças vesiculares são de grande importância para a Medicina Veterinária. A febre aftosa, a doença vesicular suína, o exantema vesicular suíno e a estomatite vesicular são doenças vesiculares clássicas de etiologia viral. Na família *Picornaviridae* estão incluídos o vírus da febre aftosa e o vírus da doença vesicular suína que ocasionam lesões vesiculares em suínos. Entretanto, dois estudos realizados no Canadá e nos EUA a partir de 2008 identificaram uma nova espécie de picornavírus, denominada *Senecavirus A*, como o mais provável agente etiológico de doença vesicular, similar à febre aftosa, em suínos. No final de 2014 e início de 2015 houve diversos relatos de doença vesicular em suínos nas fases de creche e terminação, além do aumento da incidência de doença multissistêmica em leitões, com altas taxas de mortalidade, nos principais estados brasileiros produtores de suínos. O objetivo deste estudo foi investigar a infecção natural pelo *Senecavirus A* em suínos de diferentes categorias de produção provenientes de granjas dos estados brasileiros de maior importância para a suinocultura. Para isso foram realizados três estudos. O primeiro estudo teve como objetivo investigar a infecção pelo *Senecavirus A* em surtos de doença vesicular de origem desconhecida em suínos das categorias de creche e adultos. Um conjunto de *primers* específico para amplificar um produto de 542 pb da região VP3/VP1 do genoma do vírus foi desenhado para ser utilizado na técnica de RT-PCR. Amostras clínicas de suínos foram coletadas em oito granjas com surto da doença vesicular, incluindo fluido vesicular ( $n=4$ ), swabs de vesículas rompidas ( $n=7$ ) e raspados de lesões ulcerativas ( $n=5$ ). Foram também analisados raspados de pele ( $n=52$ ) de suínos assintomáticos provenientes de granjas com e sem histórico da doença. Os agentes virais de doenças vesiculares clássicas foram investigados e não foram detectados. O RNA do *Senecavirus A* foi detectado em todas as amostras (16/16) provenientes de animais acometidos pela doença vesicular, enquanto nenhuma das amostras de animais assintomáticos foram positivas para o vírus. O segundo e o terceiro estudos descrevem, respectivamente, novas manifestações clínicas associadas ao *Senecavirus A* assim como os achados patológicos, imunohistoquímicos e moleculares associados à infecção, ambos em leitões neonatos com 1 a 5 dias de idade. No segundo estudo, foram analisadas amostras de órgãos/tecidos ( $n=81$ ) e de fezes ( $n=6$ ) de 10 leitões, provenientes de cinco granjas dos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. O terceiro estudo é complementar ao segundo e foram incluídas amostras clínicas de mais dois leitões provenientes dos estados de São Paulo e Santa Catarina, totalizando 102 amostras de órgãos/tecidos e 8 amostras de fezes. Todos os leitões incluídos nos estudos manifestaram sinais clínicos de fraqueza, letargia, salivação excessiva, hiperemia cutânea, sinais neurológicos, diarreia e/ou morte espontânea. Em conjunto, os resultados desses dois estudos revelaram que os achados de necropsia mais comuns foram impressão das costelas em pulmões ( $n=9$ ), glossite diftérica ( $n=6$ ) e lesões ulcerativas na banda coronária ( $n=5$ ). A histopatologia revelou pneumonia intersticial ( $n=12$ ), miocardite ( $n=6$ ), glossite diftérica ( $n=3$ ), encefalite ( $n=3$ ) e atrofia das vilosidades intestinais com vacuolização das células epiteliais superficiais ( $n=6$ ). A imunohistoquímica com anticorpos monoclonais específicos para *Senecavirus A* demonstrou imunorreatividade no plexo coróide do cérebro, epitélio degenerado de lesões ulcerativas da língua, uroepitélio do rim e vesícula urinária e nas células superficiais do intestino e em vários tecidos dos leitões; os ensaios moleculares para os outros vírus avaliados apresentaram resultados negativos. Os estudos descrevem pela primeira vez a infecção pelo *Senecavirus A* fora da América do Norte e sugerem que o vírus seja o agente causal dos surtos de doença vesicular descritos no Brasil, bem como a participação do vírus em

múltiplas lesões observadas em leitões neonatos, caracterizando-se como um vírus pantrópico capaz de causar doença multissistêmica em suínos infectados precocemente.

**Palavras-chave:** *Picornaviridae*. Seneca Valley virus. Suínos. Leitões. Doença vesicular.

## ABSTRACT

LEME, Raquel Arruda. **Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pork production**. 2017. 165p. Thesis (PhD degree in Animal Science; Concentration area: Animal health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

### ABSTRACT

Vesicular diseases are of great importance for Veterinary Medicine. Foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, vesicular exanthema of swine, and vesicular stomatitis are classical vesicular diseases of viral etiology. In the *Picornaviridae* family are included the foot-and-mouth disease virus and swine vesicular disease virus that cause vesicular lesions in pigs. However, two studies conducted in Canada and in the United States from 2008 identified a new species of picornavirus, known as *Senecavirus A*, as the most likely etiological agent of vesicular disease, similar to foot-and-mouth disease, in swine. At the end of 2014 and early 2015 there were several reports of vesicular disease in pigs at nursery and finishing ages, as well as an increasing in the incidence of multisystemic disease in piglets with high mortality rates in the major Brazilian pig-producing states. The objective of this study was to investigate the natural infection by *Senecavirus A* in pigs of different production categories from herds of the Brazilian states of greater importance for pork industry. Three studies were carried out. The first study aimed to investigate the *Senecavirus A* infection in outbreaks of vesicular disease of unknown etiology in weaned and adult pigs. A specific primer set for amplifying a 542 bp product from the VP3/VP1 region of the virus genome was designed for use in the RT-PCR technique. Clinical samples of pigs were collected from eight farms with vesicular disease outbreak, including vesicular fluid ( $n=4$ ), swabs of ruptured vesicle ( $n=7$ ), and scrapping of ulcerative lesions ( $n=5$ ). Cutaneous scrappings ( $n=52$ ) of asymptomatic pigs from farms with and without vesicular disease history were also analyzed. The viral agents of classic vesicular diseases were investigated and were not detected. *Senecavirus A* RNA was detected in all samples (16/16) of vesicular disease-affected animals, while none of the samples from asymptomatic pig were positive for the virus. The second and third studies describe, respectively, new clinical manifestations associated with *Senecavirus A* and pathological, immunohistochemical, and molecular findings associated with infection, both in neonatal piglets at 1 to 5 days of age. In the second study, organ/tissue samples ( $n=81$ ) and feces ( $n=6$ ) of 10 piglets from five herds of the states of Paraná, Santa Catarina, and Mato Grosso do Sul were analyzed. The third study is complementary to the second, and clinical samples of two more piglets from the states of São Paulo and Santa Catarina were included, totalizing 102 organ/tissue samples and 8 fecal samples. All piglets included in the studies showed clinical signs of weakness, lethargy, excessive salivation, cutaneous hyperemia, neurological signs, diarrhea, and/or spontaneous death. Overall, the results of these two studies revealed that the most common necropsy findings were faint rib impressions on the pleural surface of the lungs ( $n=9$ ), diphtheritic glossitis ( $n=6$ ), and ulcerative lesions at the coronary band ( $n=5$ ). Histopathology revealed interstitial pneumonia ( $n=12$ ), myocarditis ( $n=6$ ), diphtheritic glossitis ( $n=3$ ), encephalitis ( $n=3$ ), and atrophy of intestinal villi with vacuolation of the superficial epithelial cells ( $n=6$ ). Immunohistochemistry with monoclonal antibodies specific for *Senecavirus A* demonstrated immunoreactivity of the choroid plexus of the cerebrum, degenerate epithelium of ulcerative lesions of the tongue, the urothelium of the kidney and urinary bladder, and the superficial cells of the intestine and in various tissues of the piglets. The molecular tests for the other viruses evaluated showed negative results. The studies describe for the first time the infection by *Senecavirus A* outside of North America and

suggest that the virus is the causative agent of the outbreaks of vesicular disease described in Brazil, as well as the participation of the virus in multiple lesions observed in neonatal piglets, characterizing as a pantropic virus able to produce a multisystemic disease entity in pigs infected at an early age.

**Key Words:** *Picornaviridae*. Seneca Valley virus. Swine. Piglets. Vesicular disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1.2 CARACTERÍSTICAS DO SENECAVÍRUS A

**Figura 1.** Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A* ..... 19

1.4.3 Epidemiologia molecular

**Figura 2.** Relação genética entre as cepas de *Senecavirus A* disponíveis em bases públicas de dados identificadas nos EUA, Brasil, China e Canadá, desde 1988 até 2016 ..... 29

1.5.1 Animais de creche, terminação e reprodutores

**Figura 3.** Lesões vesiculares em focinho de suínos na fase de creche positivas para o *Senecavirus A* ..... 32

**Figura 4.** Lesões de casco de suínos de recria e terminação que foram positivas para o *Senecavirus A* ..... 32

1.5.2 Maternidade

**Figura 5.** Lesões crostosas e ulcerativas em região de banda coronária e coxim plantar de um leitão de 04 dias de idade ..... 35

**Figura 6.** Glossite diftérica e vascularização evidente em um leitão de 3 dias de idade ..... 35

3.1 *SENECAVIRUS A: AN EMERGING VESICULAR INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS*

**Figure 1.** Schematic diagram of *Senecavirus* genome organization, the correspondent genomic region target in the RT-PCR assay and alignment of *Senecavirus A* nucleotide (nt) sequences on which primer set design was based..... 52

**Figure 2.** Ruptured vesicle and ulcerative lesions on the coronary band and hooves of porcine idiopathic vesicular disease (PIVD)-affected animals of Parana and Santa Catarina states, southern Brazil ..... 53

**Figure 3.** Fluid-filled and ruptured vesicles on the snout of porcine idiopathic vesicular disease (PIVD)-affected animals of Parana and Santa Catarina states, southern Brazil ..... 54

**Figure 4.** (a) PK-15 monolayer – negative control; (b) cytopathic effect after 48 h postinoculation ..... 56

<b>Figure 5.</b> Alignment of amino acid (aa) sequences of <i>Senecavirus A</i> strains available in GenBank and sequences in this study .....	57
<b>Figure 6.</b> Genetic relationship of <i>Senecavirus A</i> Brazilian nucleotide sequences and other published sequences which represent picornavirus species related to vesicular disease.....	57
<b>3.2</b> <b>CLINICAL MANIFESTATIONS OF <i>SENECAVIRUS A</i> INFECTION IN NEONATAL PIGS, BRAZIL, 2015</b>	
<b>Figure 1.</b> Pathologic alterations in piglets infected with <i>Senecavirus A</i> , Brazil, 2015.....	64
<b>Figure 2.</b> Phylogenetic relationship of strains of <i>Senecavirus A</i> identified in Brazil during 2015 (black circles) and other sequences available in GenBank derived from species of picornavirus associated with vesicular disease .....	65
<b>3.3</b> <b>PATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR FINDINGS ASSOCIATED WITH <i>SENECAVIRUS A</i>-INDUCED LESIONS IN NEONATAL PIGLETS</b>	
<b>Figure 1.</b> Graphical demonstration of the distribution of the principal gross (A) and histopathological (B) findings in piglets infected with <i>Senecavirus A</i> .....	75
<b>Figure 2.</b> Pathological changes in piglets infected with <i>Senecavirus A</i> .....	76
<b>Figure 3.</b> Histopathological and immunohistochemical findings in piglets infected with <i>Senecavirus A</i> .....	77

**LISTA DE TABELAS**

**3.1 SENECAVIRUS A: AN EMERGING VESICULAR INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS**

**Table 1.** *Senecavirus A* detection by RT-PCR assay in porcine idiopathic vesicular disease (PIVD)-affected pig farms of southern Brazilian region according to the health status of the evaluated animals..... 56

**3.2 CLINICAL MANIFESTATIONS OF SENECAVIRUS A INFECTION IN NEONATAL PIGS, BRAZIL, 2015**

**Table 1.** Geographic locations and other characteristics of pig farms affected by *Senecavirus A*, Brazil, 2015 ..... 64

**Table 2.** Distribution of nucleic acid and antigens of *Senecavirus A* in 1–5-day-old piglets, Brazil, 2015 ..... 67

**3.3 PATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR FINDINGS ASSOCIATED WITH SENECAVIRUS A-INDUCED LESIONS IN NEONATAL PIGLETS**

**Table 1.** Geographical locations of farms affected, biological data and clinical findings of piglets..... 72

**Table 2.** Distribution of *Senecavirus A* antigen and nucleic acid in piglets..... 74

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	<i>Amino acid</i> (Aminoácido)
CPE	<i>Cytopathic effect</i> (Efeito citopático)
Dpi	<i>Days post-inoculation</i> (Dias pós-inoculação)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FMD	<i>Foot-and-mouth disease</i> (Febre aftosa)
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> (Imunohistoquímica)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (Sítio interno de entrada no ribossomo)
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PCV2	<i>Porcine circovirus 2</i> (Circovírus suíno tipo 2)
PEDV	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> (Vírus da diarreia epidêmica dos suínos)
PIVD	<i>Porcine idiopathic vesicular disease</i> (Doença vesicular idiopática suína)
PPV	<i>Porcine parvovirus</i> (Parvovírus suíno)
qPCR	PCR quantitativo
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerase dependente de RNA)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
RVA	Rotavírus espécie A
RVB	Rotavírus espécie B

RVC	Rotavírus espécie C
RVH –	Rotavírus espécie H
SDCoV	<i>Swine deltacoronavirus</i> (Deltacoronavírus suíno)
SVA, SenV-A	<i>Senecavirus A</i>
SVD	<i>Swine vesicular disease</i> (Doença vesicular suína)
SVV	<i>Seneca Valley vírus</i>
TGEV	Transmissible gastroenteritis vírus (Vírus da gastroenterite transmissível)
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VES	Vesicular exanthema of swine (Exantema vesicular suíno)
VN	<i>Virus neutralization</i> (Vírus neutralização)
VPg	<i>Genome-linked protein</i> (proteína ligada ao genoma)
VS	<i>Vesicular stomatitis</i> (Estomatite vesicular)

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b>	
1.1	INTRODUÇÃO .....	18
1.2	CARACTERÍSTICAS DO <i>SENECAVIRUS A</i> .....	18
1.3	HISTÓRICO .....	20
1.3.1	Doença vesicular idiopática suína.....	20
1.3.2	<i>Senecavirus A</i> associado à doença vesicular em suínos.....	21
1.3.3	<i>Senecavirus A</i> e doença vesicular em suínos no Brasil.....	22
1.3.4	<i>Senecavirus A</i> associado à síndrome multissistêmica neonatal .....	23
1.3.5	<i>Senecavirus A</i> fora do continente americano .....	24
1.4	EPIDEMIOLOGIA .....	25
1.4.1	Vias de eliminação e transmissão do <i>Senecavirus A</i> .....	25
1.4.2	Morbidade e mortalidade nas diferentes categorias de produção de suínos .....	27
1.4.3	Epidemiologia molecular .....	28
1.5	PATOGENIA, SINAIS CLÍNICOS E LESÕES.....	30
1.5.1	Animais de creche, terminação e reprodutores .....	30
1.5.2	Maternidade .....	33
1.6	IMUNIDADE .....	36
1.7	DIAGNÓSTICO .....	37
1.8	CONTROLE E PROFILAXIA .....	39
1.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	OBJETIVO GERAL .....	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>3</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	
3.1	<i>SENECAVIRUS A</i> : AN EMERGING VESICULAR INFECTION IN BRAZILIAN PIG HERDS .....	50
	Summary	51
	Introduction .....	51

Materials and methods.....	52
Results and discussion.....	55
Acknowledgments .....	58
References .....	59
<b>3.2 CLINICAL MANIFESTATIONS OF <i>SENECAVIRUS A</i> INFECTION IN NEONATAL PIGS, BRAZIL, 2015</b> .....	60
Abstract .....	63
Introduction .....	63
The study	63
Conclusions .....	65
References .....	65
<b>3.3 PATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL, AND MOLECULAR FINDINGS ASSOCIATED WITH <i>SENECAVIRUS A</i>-INDUCED LESIONS IN NEONATAL PIGLETS</b> .....	69
Summary	71
Introduction .....	71
Materials and methods.....	72
Results .....	76
Discussion.....	78
Acknowledgments .....	80
References .....	80
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	82
CONCLUSÕES .....	83
<b>5 PERSPECTIVAS</b> .....	84
PERSPECTIVAS .....	85
<b>6 APÊNDICES</b> .....	86
6.1 CAPÍTULO DE LIVRO: VIROLOGIA VETERINÁRIA .....	87
6.2 ARTIGOS TÉCNICOS .....	100
6.2.1 <i>Senecavirus A</i> e doença vesicular idiopática suína .....	100
6.2.2 Os impactos da infecção pelo <i>Senecavirus A</i> na suinocultura brasileira .....	106

6.2.3	<i>Senecavirus A</i> : uma infecção vesicular emergente em rebanhos suínícolas brasileiros .....	112
6.2.4	Atualização sobre a situação epidemiológica do Seneca Valley vírus .....	123
6.3	RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO .....	133
6.3.1	Molecular, pathological, and immunohistochemical evidence of <i>Senecavirus A</i> -induced infections in pigs of different age groups with vesicular disease from Brazil .....	133
6.3.2	First report of <i>Senecavirus A</i> in pigs of different ages with vesicular disease in Brazil .....	135
6.4	NÚMEROS DE ACESSO EM BASE PÚBLICA DE DADOS (GENBANK) DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS PARCIAIS (VP1) DAS CEPAS DE <i>SENECAVIRUS A</i> .....	138
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b> .....	139
7.1	CIRCULAR Nº18/2015/CGI/DIPOA/SDA .....	140
7.2	CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i> .....	145
7.3	LISTA DE REAGENTES .....	147
7.4	SOLUÇÕES E TAMPÕES .....	150
7.5	PROTOCOLOS DE TÉCNICAS .....	154
7.6	LISTA DE SOFTWARES .....	165

## **1 REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

---

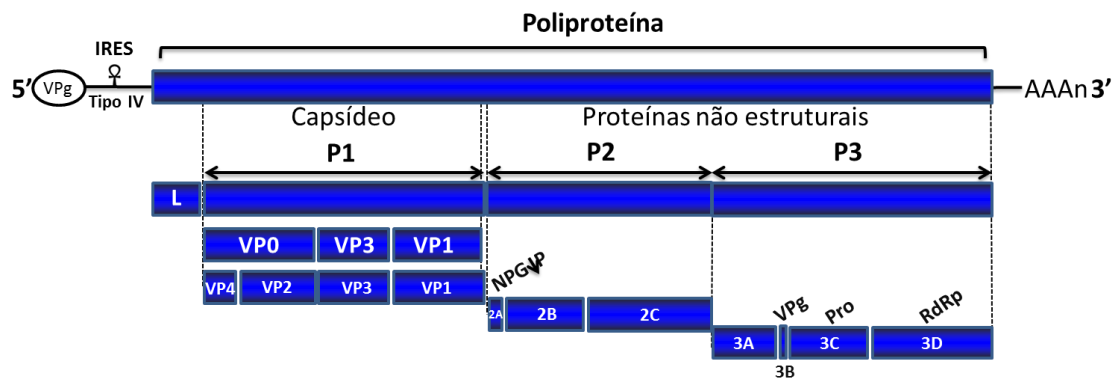
### 1.1 INTRODUÇÃO

O *Seneca Valley virus* (SVV), como foi inicialmente denominado, foi isolado pela primeira vez em Gaithersburg, cidade localizada no estado de Maryland, nos Estados Unidos da América (EUA), em 2002, a partir de meio de cultura de células. Presume-se que o vírus tenha sido introduzido no cultivo celular pelo uso de soro bovino ou tripsina suína contaminados com o SVV (KNOWLES; HALLENBECK, 2005). O nome do vírus tem sua origem no *Seneca Creek State Park*, local próximo ao laboratório (*Neotropix, Inc.*) onde o vírus foi descoberto, em Maryland (SEGALÉS et al., 2016).

Até 2014 havia apenas três sequências genômicas completas de SVV disponíveis em bases públicas de dados (números de acesso no *GenBank* NC\_011349, DQ641257 e KC667560). Consequentemente, há poucos estudos baseados no genoma completo do vírus, cujo protótipo foi denominado SVV-001 (número de acesso no *GenBank* DQ641257) (HALES et al., 2008; VENKATARAMAN et al., 2008; WILLCOCKS et al., 2011). Esses estudos permitiram a classificação definitiva do *Seneca Valley virus* como o único representante do novo gênero da família *Picornaviridae*, denominado gênero *Senecavirus*, espécie *Senecavirus A* (ICTV, 2016) (Anexo 7.1).

### 1.2 CARACTERÍSTICAS DO *SENECAVIRUS A*

O SVV-001 possui o genoma típico de outros picornavírus, com o padrão L-4-3-4, ou seja, *Leader* – 4 polipeptídeos da P1 – 3 polipeptídeos da P2 – e 4 polipeptídeos da P3. O RNA genômico do SVV consiste de aproximadamente 7200 nucleotídeos (nt), além de 666 nt na porção 5'UTR e de 71 nt na 3'UTR, com cauda poli(A). O genoma viral possui uma única ORF que codifica uma poliproteína com cerca de 2180 aminoácidos (aa) (HALES et al., 2008). A Figura 1 demonstra a representação do genoma do *Senecavirus A* antes e após o processamento da poliproteína única, precursora das demais proteínas virais.



**Figura 1.** Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*. No topo, a poliproteína precursora é flanqueada pela região 5'UTR, no qual a proteína ligada ao genoma (*genome-linked protein*, VPg) e o sítio interno de entrada ao ribossomo (*internal ribosome entry site*, IRES) do tipo IV estão representados; a cauda poli(A) está representada na porção terminal da região 3'UTR. Na porção intermediária da figura, a proteína *Leader* (L) e as três outras principais proteínas P1, P2 e P3 são apresentadas, com a indicação das sequências codificantes do capsídeo e das proteínas não estruturais. Na porção inferior, está representada cada uma das proteínas virais maduras após o processamento da poliproteína, com o padrão L-4-3-4 definido. O motif NPG↓P, conservado para os picornavírus, na porção terminal da proteína 2A está presente, assim como a VPg codificada pela 3B. A 3C protease e 3D polimerase, a qual é representada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), são apresentadas.

**Fonte:** Adaptado de Segalés et al. (2016).

A análise da sequência dos nt 1-400 da 5'UTR do protótipo SVV-001 revelou altos níveis de estruturas secundárias (HALES et al., 2008). A região 5'UTR do genoma do *Senecavirus A* possui um sítio de entrada no ribossomo (*internal ribosome entry site* - IRES), cuja função é permitir a tradução do RNA viral de forma independente por meio da inibição da tradução do RNA celular. A sequência entre os nt 406-625 apresenta identidade de 57,3% com o vírus da Hepatite C (família *Flaviviridae*), sugerindo que a IRES do SVV-001 seja do tipo IV (WILLCOCKS et al., 2011). Esse estudo corrobora resultados anteriores, em que várias estruturas secundárias a partir de flavivírus e picornavírus foram identificadas (FLATHER; SEMLER, 2015; HELLEN; DE BREYNE, 2007; MARTINEZ-SALAS et al., 2015).

As características genômicas do *Senecavirus A* são muito semelhantes às dos vírus membros do gênero *Cardiovirus*, especialmente em relação aos polipeptídeos P1, 2C, 3C e 3D. Por outro lado, o SVV-001 difere dos cardiovírus nos polipeptídeos 2B e 3A, além da IRES, que nos cardiovírus é do tipo II. As regiões 2A, 2B, 3A e 3B do SVV-001 diferem consideravelmente daquelas de todos os outros picornavírus (HALES et al., 2008).

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

### 1.3 HISTÓRICO

#### 1.3.1 Doença vesicular idiopática suína

As doenças vesiculares são de grande importância para a Medicina Veterinária. A febre aftosa (FMD), a doença vesicular suína (SVD), a estomatite vesicular (VS) e o exantema vesicular suíno (VES) são doenças vesiculares clássicas que acometem suínos. A FMD é considerada a doença animal de maior importância em todo o mundo. A SVD, VS e o VES causam sinais clínicos semelhantes aos da FMD, incluindo a manifestação de lesões vesiculares, e são clinicamente indistinguíveis da infecção pelo vírus da FMD. Portanto, todos os agentes virais de doenças vesiculares clássicas estão incluídos na lista de doenças de notificação obrigatória estabelecida pela OIE (OIE, 2016).

Casos de doença vesicular de etiologia desconhecida haviam sido descritos em suínos provenientes de diferentes países. Na Nova Zelândia, na Austrália e nos EUA (Flórida) os relatos ocorreram na década de 1980; a descrição de doença vesicular idiopática suína na Europa foi realizada no Reino Unido em 2007 e na Itália em 2010. Nos relatos da Nova Zelândia (MONTGOMERY et al., 1987) e da Austrália (MUNDAY; RYAN, 1982) a ocorrência de lesões vesiculares em suínos foi associada com alimentação à base de produtos marinhos e com vegetais (aipó, nabo e cenoura) contaminados com toxinas do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Já nos casos ocorridos na Flórida (GIBBS et al., 1983), Reino Unido (ISID, 2007) e na Itália (SENSI et al., 2010), os resultados foram negativos para as doenças vesiculares clássicas (FMD, VS, SVD, VES), não sendo identificada(s) a(s) possível(is) causas dos surtos de doença vesicular nesses animais (SEGALÉS et al., 2016).

Em nenhum dos surtos descritos anteriormente o *Senecavirus A* foi pesquisado. Na Nova Zelândia, na Austrália e na Flórida o *Senecavirus A* certamente não foi investigado devido às datas em que os eventos ocorreram, uma vez que ainda não se tinha conhecimento do vírus naquela época. Já nos casos do Reino Unido e da Itália, as informações disponíveis

referentes a esses surtos são limitadas, não sendo possível estabelecer os motivos pelos quais o *Senecavirus A* não foi investigado e impedindo uma abordagem apropriada de ambos os eventos (LEME et al., 2015).

Em 2004, em Indiana (EUA), surtos de doença vesicular foram descritos em suínos alojados em maternidade, creche e terminação. Os animais apresentavam um ou mais dos sinais clínicos de letargia, febre e lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas em mucosas oral e gengival, língua, focinho, casco, principalmente na região da banda coronária, além de claudicação. Naquela ocasião, os agentes virais responsáveis pelas infecções vesiculares clássicas (FMD, VS, SVD e VES) foram pesquisados e não foram encontradas evidências da ocorrência de alguma dessas viroses nos rebanhos acometidos. Outro vírus, atualmente denominado *Teschovirus A* e também pertencente à família *Picornaviridae*, foi detectado em amostras de alguns dos animais acometidos e também em tecidos de suínos saudáveis pertencentes ao mesmo rebanho. Por se tratar de um vírus ubíquo em populações de suínos de diferentes idades em todo o mundo, a presença do *Teschovirus A* não foi associada à ocorrência das doenças vesiculares e foi considerado apenas um achado acidental. Enfim, o agente etiológico causal das lesões vesiculares deste surto não foi identificado. Por ser de etiologia desconhecida, a doença passou a ser chamada de doença vesicular idiopática suína (AMASS et al., 2004).

### **1.3.2 *Senecavirus A* associado à doença vesicular em suínos**

Em 2007, três anos após os surtos ocorridos no estado norte-americano de Indiana, Pasma; Davidson e Shaw (2008) relataram que suínos procedentes de sete granjas do Canadá e que estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares ou ulcerativas em focinho e ao longo da banda coronária, com separação dos tecidos do casco e descamação dos seus anexos. Cerca de 80% destes animais apresentavam claudicação e apenas alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de lesões veiculares em suínos tais como os vírus da FMD, VS, SVD e VES resultaram negativos. Entretanto, por meio da técnica molecular da reação da polimerase em cadeia, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), o RNA do *Senecavirus A* foi detectado no material biológico proveniente dos suínos acometidos, sendo considerado o provável agente causal da doença vesicular naquele lote de animais (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008).

Ao longo de 20 anos (1988-2008), por meio de estudos sorológicos retrospectivos, outras 12 cepas virais, sorologicamente semelhantes ao protótipo SVV-001, foram detectadas no Laboratório Nacional de Serviços Veterinários (NVSL), em Ames, Iowa, EUA, a partir de suínos provenientes de diferentes estados norte-americanos, o que sugere que o SVV-001 e as outras cepas são comuns e estão amplamente distribuídas, tanto temporal quanto geograficamente, naquele país (HALES et al., 2008).

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

Desde 2015, vários outros surtos de doença vesicular associada à infecção pelo *Senecavirus A* têm sido relatados em rebanhos suínos nos EUA (CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; GUO et al., 2016; HAUSE et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2015), especialmente em animais de reprodução, colocando em alerta as autoridades sanitárias daquele país.

### **1.3.3 *Senecavirus A* e doença vesicular em suínos no Brasil**

Desde o final de 2014 e o início de 2015 surtos de doença vesicular em suínos nas fases de creche, terminação e em reprodutores foram relatados nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os casos relatados no Paraná e em Santa Catarina foram investigados por pesquisadores brasileiros da Universidade Estadual de Londrina (LEME et al., 2015), enquanto os casos descritos em Minas Gerais e Goiás foram investigados por pesquisadores da Universidade de Minnesota, EUA (VANNUCCI et al., 2015).

O estudo realizado pelo grupo brasileiro identificou o *Senecavirus A* a partir de líquido de vesículas de suínos adultos, em lesões vesiculares de língua e mucosa oral e em raspados cutâneos de lesões vesiculares de animais de 22 a 65 dias de idade. Animais assintomáticos de granjas suinícolas, com e sem relatos da doença, também foram amostrados e foram negativos para todos os agentes virais pesquisados, incluindo o *Senecavirus A*. Por meio de técnicas moleculares, como PCR, RT-PCR e PCR quantitativa (qPCR), que não exigem a manipulação do agente viral, outros picornavírus (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), previamente descritos como possíveis agentes causais de lesões cutâneas em suínos e/ou já identificados em rebanhos suinícolas brasileiros, foram também pesquisados, não tendo sido detectados (LEME et al., 2015).

Paralelamente, os estudos conduzidos nos EUA a partir de amostras biológicas de rebanhos suínos acometidos pela doença vesicular provenientes dos estados de Minas Gerais e Goiás confirmaram a presença do *Senecavirus A* nos animais avaliados (VANNUCCI et al., 2015).

Tendo como base os resultados negativos para outras importantes doenças vesiculares suínas, na epidemiologia dos surtos e na detecção do genoma do *Senecavirus A* em animais acometidos e do isolamento do vírus a partir de líquido de vesícula desses animais, este vírus foi considerado o mais provável agente causal da doença vesicular suína relatada nos rebanhos brasileiros (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015). Posteriormente, outro estudo conduzido por pesquisadores brasileiros a partir de amostras de tecidos e soro de suínos com suspeita de doença vesicular associada ao *Senecavirus A* e provenientes dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul também detectou o RNA do vírus (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016). Estes foram os primeiros relatos do *Senecavirus A* fora do território norte-americano, o que sugere que o vírus seja um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira (LEME et al., 2015; VANNUCCI et al., 2015).

#### **1.3.4 *Senecavirus A* associado à síndrome multissistêmica neonatal**

Simultaneamente aos casos de doença vesicular que estavam ocorrendo no Brasil, também foram relatados aumentos nas taxas de mortalidade em leitões neonatos, ou seja, entre um e cinco dias de idade, nas principais regiões brasileiras produtoras de suínos. Os sinais clínicos relatados nos leitões incluíam letargia, hiperemia cutânea, diarreia, sinais

neuroológicos e/ou morte súbita (VANNUCCI et al., 2015, LEME et al., 2016a, 2016b). Leitões que apresentaram morte espontânea foram submetidos à investigação diagnóstica e apresentaram resultados positivos para o *Senecavirus A* em diferentes órgãos/tecidos, tanto pela técnica de RT-PCR quanto por imunohistoquímica. Infecções por outros agentes virais responsáveis por quadros clínicos semelhantes, como os picornavírus entéricos suínos (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), Parvovírus suíno (PPV), Circovírus suíno-2 (PCV2), *Rotavirus A* (RVA), *B* (RVB), *C* (RVC) e *H* (RVH), Vírus da diarreia epidêmica dos suínos (PEDV), Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV) e o Deltacoronavírus suíno (SDCoV) foram descartadas após resultados negativos em testes diagnósticos realizados a partir de amostras dos mesmos animais (LEME et al., 2016a, 2016b).

Poucos meses após os casos relatados no Brasil, a infecção pelo *Senecavirus A* também foi associada ao aumento da incidência de mortalidade em leitões neonatos nos EUA, especialmente em granjas que possuíam matrizes com histórico de lesões vesiculares (CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016).

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

### **1.3.5 *Senecavirus A* fora do continente americano**

Em 2015, na China, suínos de granjas localizadas na província de Guangdong apresentaram doença vesicular, incluindo úlceras nas cavidades oral e nasal, anorexia, claudicação e morte súbita de leitões neonatos. As amostras derivadas desses surtos foram negativas para as doenças vesiculares clássicas; entretanto, apresentaram resultados positivos para o *Senecavirus A* (WU et al., 2016a, 2016b). De acordo com o que se conhece na literatura atual, não havia, até então, relatos sobre a infecção pelo *Senecavirus A* fora do continente americano.

## 1.4 EPIDEMIOLOGIA

O ano de 2015 pode ser considerado um divisor na epidemiologia da infecção pelo *Senecavirus A*. Entre os aspectos da infecção que reforçam essa afirmação estão a distribuição geográfica do vírus, as categorias de produção acometidas, os sinais clínicos associados à infecção e a gravidade da doença.

Antes de 2015, o *Senecavirus A* somente havia sido descrito em animais provenientes de países norte-americanos. Até aquele ano, nos EUA, haviam ocorrido apenas casos isolados de doença vesicular em suínos associada à infecção pelo *Senecavirus A* (LEME et al., 2015). Contudo, em 2015, o vírus foi descrito pela primeira vez fora da América do Norte, ampliando a sua distribuição geográfica. No Brasil, onde em praticamente cinco meses o vírus se disseminou por rebanhos de todos os principais estados brasileiros produtores de suínos, o *Senecavirus A* foi descrito como agente causal de doença vesicular em suínos de creche e terminação e em reprodutores, além de ter sido associado pela primeira vez à doença multissistêmica em leitões neonatos (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al., 2016; LEME et al., 2015, 2016a, 2016b; VANNUCCI et al. 2015). A partir de então, surtos da infecção pelo *Senecavirus A* em leitões de até uma semana de idade passaram a ser relatados também nos EUA (CANNING et al, 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016).

Ainda em 2015 houve a primeira descrição do *Senecavirus A* fora do continente americano, causando doença vesicular em matrizes e morte em leitões neonatos na província de Guangdong, China (WU et al., 2016a, 2016b). Em março de 2016, outro surto de doença vesicular associado à infecção pelo *Senecavirus A* foi relatado em leitões na província de Hubei, também na China (QIAN et al., 2016).

### 1.4.1 Vias de eliminação e transmissão do *Senecavirus A*

Apesar de ter sido demonstrada a circulação do *Senecavirus A* em rebanhos suínos dos EUA desde o final da década de 1980, a ocorrência de surtos em outros países (Brasil e China) e os sinais clínicos associados à infecção, pouco se sabe sobre a origem do *Senecavirus A*, seus reservatórios naturais, vias de transmissão e patogenia da infecção (BRACHT et al., 2016; JOSHI; DIEL, 2015; LEME et al., 2016b).

Após diversos surtos da infecção pelo *Senecavirus A* terem sido relatados em suínos durante o verão de 2015 nos EUA, 2.033 amostras de fluído oral de suínos assintomáticos

provenientes de 25 estados norte-americanos foram investigadas pela técnica de RT-PCR para a identificação do *Senecavirus A* e apenas 1,2% das amostras avaliadas, provenientes de cinco estados diferentes, foram positivas para o vírus (HAUSE et al., 2016). Por outro lado, o RNA do *Senecavirus A* foi amplificado a partir de diferentes amostras biológicas de suínos de engorda/terminação com doença vesicular. Líquido vesicular e áreas com lesões vesiculares de animais naturalmente infectados apresentaram alta carga viral ( $2 \times 10^7$  a  $1,2 \times 10^{11}$  cópias genômicas/mL) (GUO et al., 2016), sugerindo que o contato direto entre animais com lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas e indivíduos suscetíveis provavelmente represente uma das mais importantes vias de transmissão do vírus.

A excreção do *Senecavirus A* também foi demonstrada em amostras de fezes tanto de leitões que apresentavam sinais clínicos multissistêmicos, incluindo diarreia (LEME et al., 2016a, 2016b), quanto de suínos de creche/terminação com lesões vesiculares naturalmente infectados pelo vírus (GUO et al., 2016). Adicionalmente, testes de imunohistoquímica e de RT-PCR revelaram a presença do *Senecavirus A* no epitélio urinário de leitões com doença multissistêmica, o que sugere que a urina possa ser uma possível fonte de contaminação em unidades produtoras de leitões acometidas pela infecção (LEME et al., 2016a, 2016b).

A infecção experimental de suínos na fase de terminação com o *Senecavirus A* revelou a excreção viral por até 28 dias pós-inoculação (dpi) (JOSHI et al., 2016b). Todos os animais infectados excretaram o *Senecavirus A* nas secreções oral e nasal e nas fezes entre o 3° e 14° dpi; o pico de excreção ocorreu entre o 1° e 5° dpi, especialmente em secreção oral, que apresentou carga viral mais alta que secreção nasal e fezes. Após o 14° dpi, apenas alguns animais mantiveram a excreção viral até 28 dpi e não foi possível detectar o RNA do *Senecavirus A* em nenhum dos animais no 35° dpi (JOSHI et al., 2016b). Adicionalmente, o isolamento do *Senecavirus A* infeccioso em cultivo celular foi realizado com sucesso a partir de secreção oral até o 21° dpi, das fezes até o 10° dpi e da secreção nasal até o 7° dpi (JOSHI et al., 2016b). Portanto, a presença de secreções, especialmente oral e nasal, e excreções, ou seja, fezes e urina, de animais infectados pelo *Senecavirus A* possivelmente contribuem para a disseminação do vírus tanto por meio de transmissão direta, pelo contato entre animais de uma mesma baia, quanto indireta, na qual o agente viral contamina o ambiente, impactando na epidemiologia da infecção.

Um estudo realizado em 2015 em granjas suinícolas com e sem histórico de doença vesicular detectou e isolou pelas técnicas de RT-PCR quantitativa e isolamento em cultivo

celular, respectivamente, o *Senecavirus A* a partir de amostras de intestino delgado e fezes dos ratos provenientes das granjas com histórico da infecção (JOSHI et al., 2016a). No mesmo estudo, o RNA do vírus também foi detectado em moscas domésticas coletadas em granjas acometidas e em uma granja sem histórico clínico da presença de animais com doença vesicular. A detecção de RNA do vírus em moscas domésticas e a partir de amostras biológicas provenientes de ratos, bem como o isolamento de partículas virais viáveis em amostras de intestino delgado e fezes dos roedores sugerem que essas espécies possam desempenhar algum papel na epidemiologia da infecção (JOSHI et al., 2016a). A entrada de pessoal; veículos, especialmente aqueles utilizados para o transporte de animais e rações; e equipamentos para remoção de carcaça contaminados também foram apontados como possíveis vias de introdução e transmissão indireta do *Senecavirus A* em diferentes granjas dos EUA (BAKER et al., 2017).

Um estudo conduzido no Brasil investigou o *Senecavirus A* em 10 leitões neonatos, dos quais sete tinham entre um e dois dias idade. Todos os leitões incluídos naquele estudo apresentaram sinais clínicos agudos da infecção e morreram espontaneamente (LEME et al., 2016a). As lesões patológicas e a detecção do *Senecavirus A* por RT-PCR e por imunohistoquímica em múltiplos tecidos/órgãos dos sete leitões neonatos sugerem a possibilidade de transmissão vertical. Entretanto, mais estudos devem ser realizados nessa linha de pesquisa para confirmar essa via de transmissão.

#### **1.4.2 Morbidade e Mortalidade nas diferentes categorias de produção de suínos**

As taxas de morbidade e mortalidade de doença associada ao *Senecavirus A* variam de acordo com as categorias de produção acometidas. Os surtos de doença associada ao *Senecavirus A* disseminam-se rapidamente entre os rebanhos. Dentro de um lote ou de cada rebanho onde há a infecção pela primeira vez, as taxas de morbidade variam entre 4 e 70%, na dependência do conjunto de sinais clínicos apresentados e da faixa etária/categoria dos animais (BAKER et al., 2017; CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; LEME et al., 2015). Não há relatos da ocorrência de novos surtos em granjas previamente acometidas. Acredita-se que, posteriormente, há tendência da infecção tornar-se endêmica, com a maioria dos animais assintomáticos e a manifestação de sinais clínicos apenas nos animais não infectados previamente, soronegativos ou, até mesmo, com baixos títulos de anticorpos.

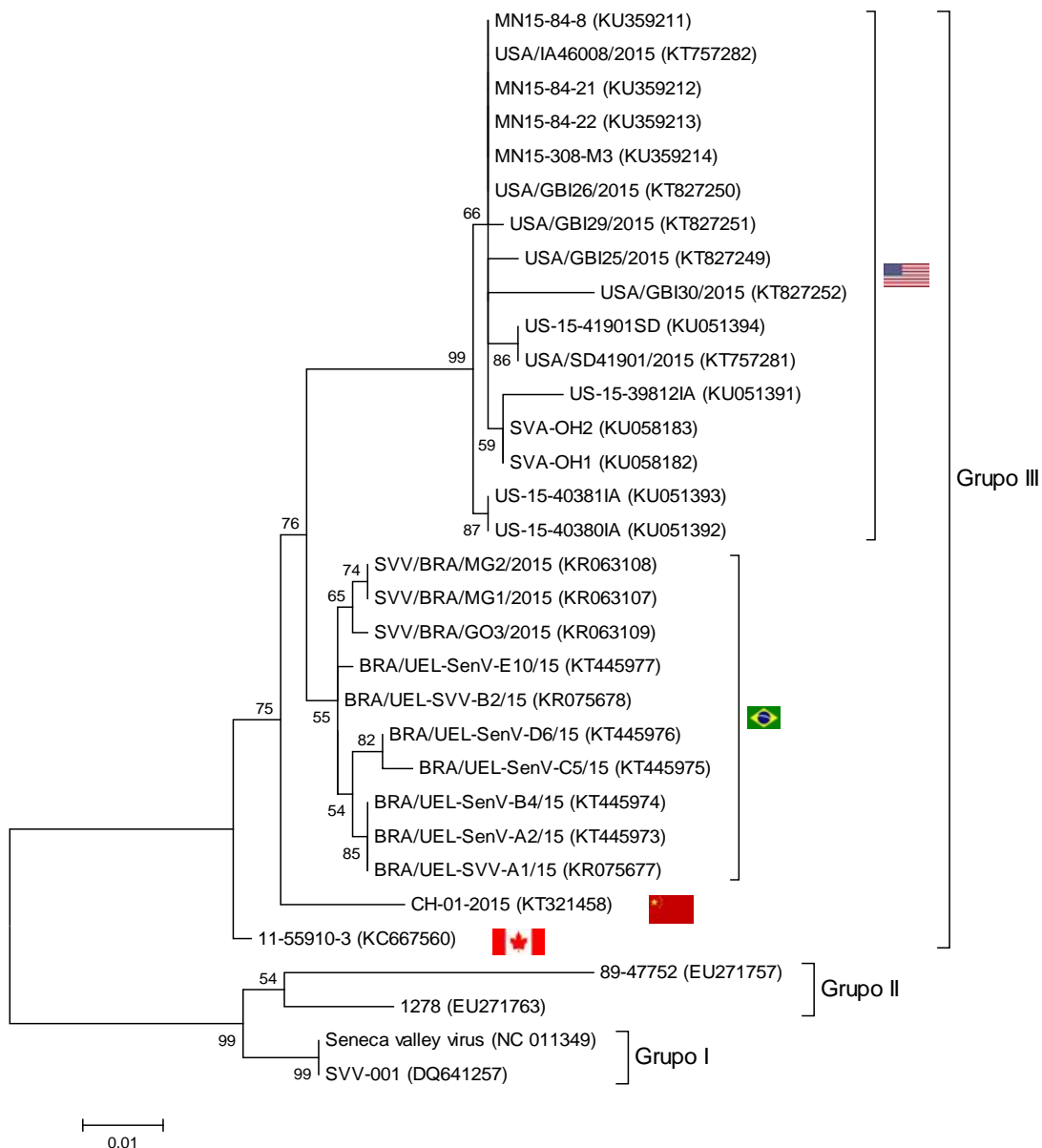
Na dependência da região geográfica e dos rebanhos de origem, os surtos da doença apresentaram morbidade entre 0,5 e 5% para animais na fase de creche e de 5 a 30% para terminação e reprodutores (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; LEME et al., 2015; SEGALÉS et al., 2016). Excepcionalmente são relatadas taxas maiores de morbidade em matrizes, podendo chegar a 70-90% em algumas granjas (BAKER et al., 2017). As taxas de morbidade têm reflexos negativos expressivos para a produtividade uma vez que, em muitas granjas onde a doença vesicular foi relatada, a população de animais era relativamente grande. Em alguns casos a população total de suínos era de aproximadamente 30 mil, incluindo animais de diferentes categorias de produção (A. A. ALFIERI, comunicação pessoal). Em relação à mortalidade nessas categorias, de acordo com produtores e/ou responsáveis por granjas das principais regiões brasileiras produtoras de suínos, as taxas foram baixas ( $\pm 0,2\%$ ) e de difícil mensuração, uma vez que a doença geralmente não ocasiona a morte de animais adultos, que podem ser recuperar após a remissão dos sinais clínicos.

Para animais de maternidade as taxas de morbidade e mortalidade aumentam consideravelmente, especialmente em leitões entre um e quatro dias de idade. Nos casos de primo-infecção nessa faixa etária, as taxas de morbidade podem chegar a até 70%, enquanto as taxas de mortalidade variam entre 15 e 30%. Entretanto, a manifestação dos sinais clínicos e as altas taxas de mortalidade são transientes; a mortalidade retorna aos índices aceitáveis em duas a três semanas após o início da síndrome (BAKER et al., 2017; CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; LEME et al., 2016a, 2016b; SEGALÉS et al., 2016).

### **1.4.3 Epidemiologia molecular**

Após a ocorrência e/ou o aumento da incidência de surtos de doença associada ao *Senecavirus A* nos EUA, Brasil e China, sequências genômicas completas do vírus foram estabelecidas a partir de cepas de origem em cada um desses países (GUO et al., 2016; VANNUCCI et al., 2015; WANG et al., 2016; WU et al., 2016a, 2016b; ZHANG et al., 2015). Conseqüentemente, algumas inferências sobre a epidemiologia molecular do *Senecavirus A*, ainda que de maneira limitada, podem ser realizadas. As sequências genômicas completas de *Senecavirus A* disponíveis até o final de 2015 apresentam, aproximadamente, 94% a 98% de similaridade entre si nas suas sequências de nt e aa, respectivamente (SEGALÉS et al., 2016). As menores identidades foram encontradas entre a cepa protótipo SVV-001 e uma cepa de origem norte-americana determinada em 2015. A

partir da análise do gene da VP1, as cepas de *Senecavirus A* conhecidas até então se agrupam em 3 grupos distintos, onde o grupo I contém o protótipo SVV-001, o grupo II contém as cepas norte-americanas identificadas entre 1988 e 1997 e o grupo III possui as cepas de *Senecavirus A* originárias do Brasil, Canadá, China e EUA identificadas entre 2011 e 2015 (Figura 2) (SEGALÉS et al., 2016).



**Figura 2.** Relação genética entre as cepas de *Senecavirus A* disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*) identificadas nos EUA, Brasil, China e Canadá, desde 1988 até 2016. A árvore filogenética, construída a partir de 540 pb da região VP1 do *Senecavirus A*, indica o agrupamento das cepas do vírus em três clusters, de acordo com o país e o período de identificação.

**Fonte:** Adaptado de Segalés et al. (2016).

## 1.5 PATOGENIA, SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

### 1.5.1 Animais de creche, terminação e reprodutores

A associação de doença clínica com o *Senecavirus A* é recente e, portanto, a biologia e patogênia do vírus são pouco esclarecidas, bem como o seu sítio primário de replicação e período de incubação. A infecção experimental de suínos com 4 meses de idade com uma cepa contemporânea de *Senecavirus A* revelou que as tonsilas dos animais infectados apresentaram carga viral mais alta que os demais tecidos avaliados. Vírus infeccioso foi isolado a partir de tonsilas até o 7º dpi, o que sugere que as tonsilas podem ser um dos sítios primários de replicação do *Senecavirus A* durante a fase aguda da infecção (JOSHI et al., 2016b). Neste, e também em outro estudo experimental em suínos com nove semanas de idade, o período de incubação do vírus foi de 4-5 dias (JOSHI et al., 2016b; MONTIEL et al., 2016). O período de viremia foi curto, de aproximadamente 7 dias, com pico de cópias genômicas do vírus ( $\approx 1 \times 10^{6,5}$ /mL) ocorrendo no 3º dpi com subsequente redução progressiva, até não ser mais detectado após o 10º dpi, coincidindo com a fase aguda da doença (JOSHI et al., 2016b).

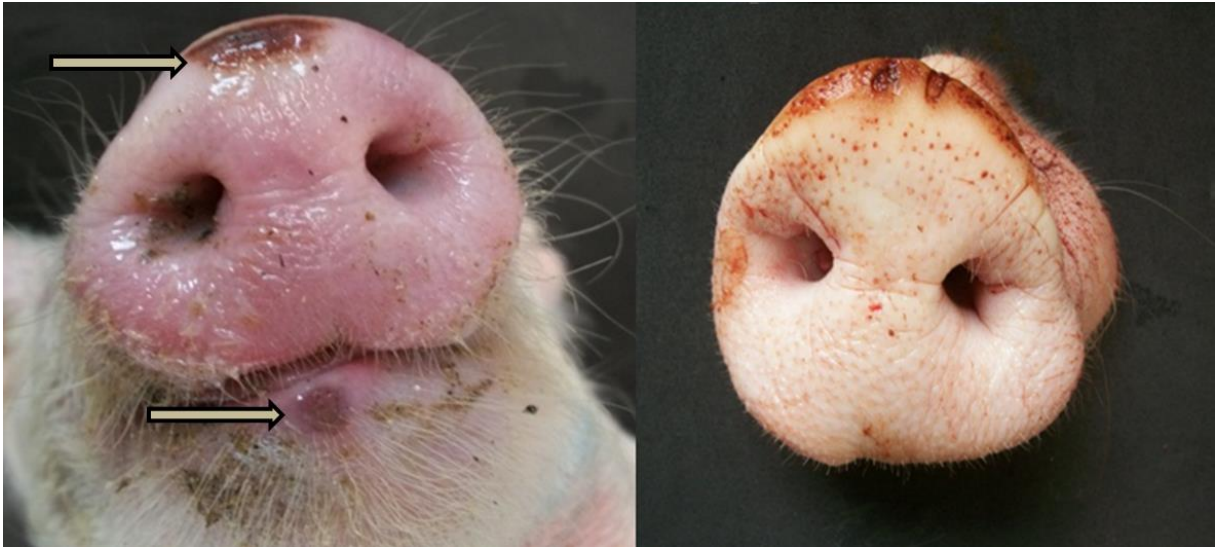
Com base nos relatos descritos no Brasil, EUA e China, os sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* em suínos são clinicamente indistinguíveis daqueles causados pelos vírus classicamente associados à doença vesicular (FMD, VS, SVD, VES), em que a formação de vesículas nas regiões de mucosa oral, focinho e pés e a ocorrência de febre são características comuns (LEME et al., 2015; SEGALÉS et al., 2016; WU et al., 2016b).

Os sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* em suínos alojados nas fases de creche e terminação e em reprodutores podem ser lesões vesiculares íntegras semelhantes a aftas, preenchidas com fluido (CANNING et al., 2016; GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2016; LEME et al., 2015; SINGH et al., 2012; VANNUCCI et al., 2015); essas vesículas permanecem íntegras por um curto período de tempo, em alguns casos por poucas horas, e rapidamente se rompem, apresentando-se como úlceras epiteliais (JOSHI et al., 2016b, SEGALÉS et al. 2016). As lesões são comuns na cavidade oral, no focinho e nas extremidades dos membros. Adicionalmente, também podem aparecer vesículas cutâneas. O aparecimento de vesículas pode ser antecedido por um curto período de anorexia e febre (39,5 °C–40,8 °C) (SEGALÉS et al., 2016; WU et al., 2016b), entretanto, febre parece não ser um evento comum. Os sinais clínicos nas granjas persistem por 10 a 20 dias (JOSHI et al., 2016b, SEGALÉS et al. 2016, WU et al., 2016b), na dependência do tamanho da população de

suínos da granja. As infecções bacterianas secundárias podem agravar o quadro clínico (VANNUCCI et al., 2015).

Em animais de creche, terminação e em reprodutores as lesões macroscópicas surgem, inicialmente, como áreas esbranquiçadas ou eritematosas que, posteriormente, evoluem para a formação de vesículas (JOSHI et al., 2016b; SINGH et al., 2012). As lesões vesiculares são comuns na cavidade oral, principalmente na mucosa oral, na gengiva, na língua e nos lábios; em focinho (Figura 3) e nas extremidades dos membros, principalmente no espaço interdigital e na região da borda coronária dos cascos (Figura 4), podendo-se observar separação da coroa do casco, fissuras, desprendimento das úngulas de seus anexos e, conseqüentemente, claudicação (JOSHI et al., 2016b; LEME et al., 2015; SINGH et al., 2012). Os animais podem apresentar lesões vesiculares íntegras, preenchidas com fluido seroso, serosanguinolento ou, em casos em que há infecção bacteriana secundária, purulento (SEGALÉS et al., 2016). Após a ruptura, as lesões apresentam-se como úlceras epiteliais (WU et al., 2016b) que podem ou não estar recobertas por exsudato serofibrinoso. Outros achados de necropsia descritos em matriz com lesões vesiculares incluem linfonodos edemaciados e hemorrágicos, enfisema e pneumonia lobular, hemorragia de miocárdio, pontos esbranquiçados em fígado e rins, hemorragia grave e congestão de baço e nas superfícies do cérebro e cerebelo (WU et al., 2016b). Como em outras doenças vesiculares, a cicatrização das úlceras inicia-se cerca de sete dias após o aparecimento e a reparação completa do tecido epitelial se completa em duas semanas (JOSHI et al., 2016b).

Os sinais clínicos associados à infecção pelo *Senecavirus A* em estudos experimentais ficaram restritos à manifestação de doença vesicular (JOSHI et al., 2016b; MONTIEL et al., 2016). Entretanto, a avaliação da carga viral e da distribuição do *Senecavirus A* em tecidos de animais experimentalmente infectados revelou a presença do RNA do *Senecavirus A* e de partículas virais infecciosas em pulmões, linfonodos mediastínicos e mesentéricos, fígado, baço, intestinos delgado e grosso e tonsilas durante a fase clínica aguda da doença (JOSHI et al., 2016b). Aos 38 dpi o RNA do vírus foi também detectado em diversos órgãos dos animais coalescentes, com exceção dos pulmões, coração e fígado; entretanto não foi possível o isolamento de vírus infeccioso a partir de nenhum dos tecidos molecularmente positivos para o vírus (JOSHI et al., 2016b). Adicionalmente, o RNA do *Senecavirus A* foi detectado em amostras de soro ( $1,1 \times 10^2$  a  $8 \times 10^5$  cópias genômicas/mL) no 3º dpi, ou seja, imediatamente antes do aparecimento de lesões vesiculares (JOSHI et al., 2016b; MONTIEL et al., 2016).



**Figura 3.** Lesões vesiculares em focinho e lábio inferior de suínos na fase de creche positivas para o *Senecavirus A*.

**Fonte:** Laboratório de Virologia Animal/Patologia Animal – Universidade Estadual de Londrina, 2015.



**Figura 4.** Lesões vesiculares ulcerativas de casco de suínos de recria e terminação que foram positivas para o *Senecavirus A*.

**Fonte:** Laboratório de Virologia Animal/Patologia Animal – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

As alterações microscópicas descritas em animais dessas categorias incluem a observação de hiperqueratose ortoqueratótica e paraqueratótica nos membros, além de ulceração focal contendo debris celulares, neutrófilos íntegros e degenerados em meio a fibrina (SINGH et al., 2012). Na derme foi observado discreto infiltrado inflamatório perivascular composto por neutrófilos, linfócitos e plasmócitos acompanhado por edema e tecido de granulação (SINGH et al., 2012). Ulcerações com características morfológicas semelhantes foram observadas na cavidade oral e focinho (SINGH et al., 2012). Podem também ser observadas hemorragia e congestão do miocárdio e enfisema; necrose da mucosa

intestinal; infiltrações de linfócitos, monócitos e células plasmáticas acompanhada de necrose focal de hepatócitos (WU et al., 2016b).

Sob as condições experimentais de infecção em suínos as alterações microscópicas durante a fase clínica aguda da doença ficaram restritas às tonsilas, baço, linfonodos, que apresentaram hiperplasia linfoide leve a moderada, e aos pulmões. Neste caso, foi observada discreta atelectasia multifocal e, ocasionalmente, congestão difusa com discreto acúmulo perivascular multifocal de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (JOSHI et al., 2016b). Entretanto, os estudos com base em alterações microscópicas em suínos de creche e terminação e reprodutores acometidos pelo *Senecavirus A* são limitados e investigações histopatológicas mais complexas da infecção em animais dessas categorias devem ser realizadas.

A manifestação dos sinais clínicos resulta na dificuldade de movimentação e locomoção dos animais acometidos, devido à claudicação (WU et al., 2016b; SINGH et al., 2012), o que impede o deslocamento até os comedouros. Adicionalmente, as lesões da cavidade oral não permitem que os animais se alimentem adequadamente (BAKER et al., 2017). Conseqüentemente, ocorre redução na eficiência da conversão alimentar e a queda abrupta do ganho de peso diário dos animais. Não se pode deixar de destacar a questão de bem-estar dos animais acometidos que se torna, invariavelmente, comprometida (LEME et al., 2015; PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008).

Outro agravante importante nos impactos da infecção é que animais de terminação com lesões vesiculares ativas e/ou cicatrizadas na linha de abate são desviados para inspeção e não podem mais ser exportados e/ou são processados como produto submetido à cocção (A. A. ALFIERI, comunicação pessoal). Essa conduta de inspeção sanitária contribui consideravelmente com aumento nos custos da doença clínica para o produtor e, com isso, aumenta a importância da infecção. Portanto, as perdas na produtividade dos rebanhos devido à doença vesicular ocasionada pelo *Senecavirus A* podem ser expressivas, com impactos econômicos negativos que se refletem em toda a cadeia produtiva.

### **1.5.2 Maternidade**

Na maternidade, os sinais clínicos apresentados por matrizes são semelhantes àqueles descritos anteriormente. Entretanto, leitões de até uma semana de idade podem apresentar

sinais clínicos distintos daqueles descritos para suínos de outras faixas etárias. Os sinais clínicos em leitões neonatos, especialmente entre um e quatro dias de idade, são mais graves e incluem fraqueza, letargia, hiperemia cutânea, relutância em mamar, sialorreia, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita (CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA, 2016; LEME et al., 2016a, 2016b; VANNUCCI et al., 2015; WU et al., 2016b). A maioria dos animais acometidos nessa faixa etária vem a óbito dentro de pouco tempo (um a dois dias) após o início dos sinais. Nos leitões que sobrevivem, os sinais clínicos persistem por três a 10 dias e depois desaparecem (LEME et al., 2016a, 2016b). Entretanto, esses animais apresentam taxas ineficientes de conversão alimentar, ganho diário de peso e crescimento, caracterizando-se como refugos.

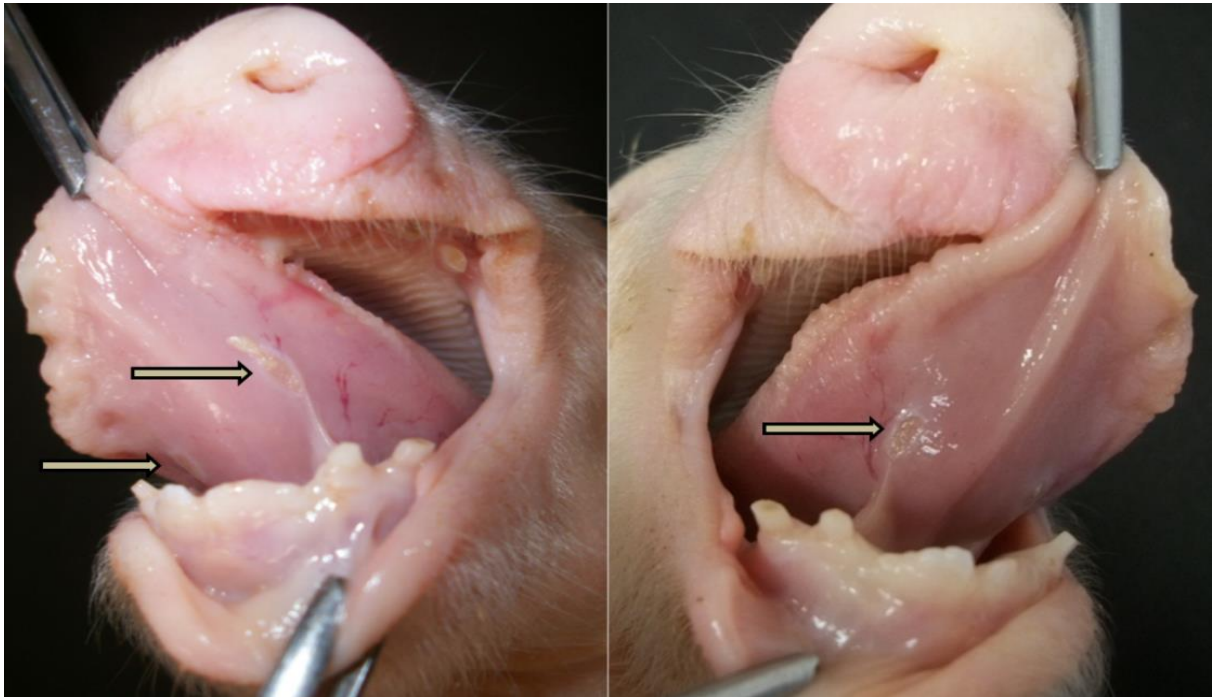
Geralmente, os leitões acometidos são mais suscetíveis a outras infecções, tanto por outros agentes virais quanto por outras classes de micro-organismos, como bactérias e protozoários (CANNING et al., 2016; LEME et al., 2016a, 2016b; SEGALÉS et al., 2016). Na maioria das granjas acometidas, a síndrome multissistêmica associada à infecção pelo *Senecavirus A* persiste por duas a três semanas (BAKER et al., 2017; SEGALÉS et al., 2016). Em algumas granjas com maior número de leitões alojados a taxa alta de mortalidade regular nessa categoria animal pode se manter aumentada por até quatro semanas (A. A. ALFIERI, comunicação pessoal).

Em leitões neonatos, as alterações macroscópicas incluem lesões ulcerativas e/ou crostosas cutâneas multifocais em diferentes localizações anatômicas, incluindo a região ventral da mandíbula, metacarpo, vulva, articulação metatarsofalangeana e de banda coronária (Figura 5); aumento dos linfonodos; impressão das costelas na superfície pleural dos pulmões; edema pulmonar; congestão dos vasos meníngeos; hemorragias petequiais dos rins; gengivite e glossite diftérica e/ou necrotizante (Figura 6) (LEME et al., 2016a, 2016b; WU et al., 2016b). Fezes líquidas, indicativo de diarreia, foram observadas no intestino delgado de leitões. Outros achados são a presença de vesículas cutâneas íntegras ou rompidas, congestão da mucosa do intestino delgado, esplenomegalia e onfalite (LEME et al., 2016a, 2016b). Adicionalmente, os estômagos dos leitões costumam estar cheios de leite, o que afasta a possibilidade de inanição como causa dos sinais clínicos, especialmente a letargia e/ou morte súbita (LEME et al., 2016a, 2016b; SEGALÉS et al., 2016).



**Figura 5.** Lesões crostosas e ulcerativas em região de banda coronária e coxim plantar de um leitão de 04 dias de idade.

**Fonte:** Laboratório de Virologia Animal/Patologia Animal – Universidade Estadual de Londrina, 2015.



**Figura 6.** Glossite diftérica em leitões de 03 dias de idade.

**Fonte:** Laboratório de Virologia Animal/Patologia Animal – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

Entre as alterações microscópicas em leitões, pode-se observar gengivite necrotizante; estomatite necrotizante; queilite necrotizante com degeneração balonosa de células epiteliais; dermatite necrotizante; depleção linfóide em tonsilas, baço e linfonodos; miocardite linfocítica; edema e congestão pulmonar e pneumonia intersticial; degeneração balonosa do epitélio transicional da vesícula urinária e dos ureteres; hemossiderose em linfonodos (LEME et al., 2016a, 2016b; WU et al., 2016b). Pode, ainda, ser observada vacuolização das células epiteliais superficiais de intestino delgado de leitões com histórico clínico de diarreia e

atrofia, achatamento e fusão das vilosidades intestinais. Em sistema nervoso central os achados incluem encefalite linfoplasmacítica, congestão cerebral e cerebelar, meningite não purulenta no cerebelo (LEME et al., 2016a, 2016b; WU et al., 2016b).

## 1.6 IMUNIDADE

Os títulos de anticorpos específicos contra o *Senecavirus A* foram investigados tanto em condições experimentais quanto em infecção natural; entretanto são poucos os estudos direcionados à essa linha de investigação. O primeiro estudo a avaliar a imunidade específica para o vírus foi conduzido a partir de infecção experimental de suínos (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012). Os animais apresentaram soroconversão no 6º dpi, mesmo não apresentando sinais clínicos de doença. O perfil da resposta humoral foi estabelecido com base no teste de ELISA indireto, em que a imunoglobulina (Ig)M específica para o *Senecavirus A* foi detectada a partir do 5º-6º dpi e manteve a concentração máxima até 14 dpi. A partir de então, a concentração sérica de IgM passou a declinar até títulos indetectáveis aos 21 dpi. No mesmo estudo, títulos séricos de IgG desenvolveram-se tardiamente e mostraram forte resposta positiva 21 dpi e mantiveram-se altos durante os 57 dias do experimento (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012).

Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos experimentais. No estudo conduzido em suínos de nove semanas de idade, os títulos de anticorpos contra o vírus, detectados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), foram  $\geq 640$  em cerca de 15 dpi (MONTIEL et al., 2016). Suínos de quatro meses de idade experimentalmente infectados com o *Senecavirus A* desenvolveram resposta imunológica rápida contra o vírus, com títulos de anticorpos neutralizantes sendo detectados pela técnica de vírus neutralização (VN) a partir do 5º dpi. Anticorpos isotipo IgG *Senecavirus A*-específicos foram revelados por IFI no 10º dpi (JOSHI et al., 2016b). Altos títulos de anticorpos neutralizantes foram também detectados ao final do experimento (38 dpi). Neste estudo, os títulos crescentes de anticorpos neutralizantes ocorreram simultaneamente à redução da gravidade do quadro clínico, da viremia, da excreção viral e da carga viral nos tecidos dos animais experimentalmente infectados, o que sugere que anticorpos neutralizantes possam atuar na remoção do *Senecavirus A* (JOSHI et al., 2016b).

A soroconversão para o *Senecavirus A* foi demonstrada, pela técnica de IFI, em suínos naturalmente acometidos pela infecção, com títulos de anticorpos variando entre 160 a 1.280 em duas a três semanas após o surto clínico da doença (GUO et al., 2016). Outro estudo, de caráter longitudinal, avaliou a dinâmica da resposta imune (IgG) para o *Senecavirus A* em infecção natural, a partir de matrizes e em suas respectivas leitegadas, pelo teste de ELISA indireto específico para a detecção de anticorpos contra a proteína VP1 do vírus. A soroconversão ocorreu em 100% das matrizes em que o RNA do *Senecavirus A* foi detectado, independentemente de apresentarem ou não os sinais clínicos da infecção. Os títulos de anticorpos IgG anti-VP1 do *Senecavirus A* aumentaram significativamente na 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> semanas após o início dos sinais clínicos e atingiram um *plateau* que perdurou até o final do período observacional que ocorreu na sexta semana (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016).

No mesmo estudo, três semanas após o início da doença clínica, o RNA viral em amostras de soro dos mesmos animais alcançou número de cópias não mais detectável pelo sistema de RT-PCR utilizado no estudo, sugerindo que a viremia possa ter sido reduzida pela presença de anticorpos VP1-neutralizantes (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016). Ainda nesse estudo, a avaliação da resposta imune IgG-específica foi também realizada em leitões provenientes dessas mesmas matrizes (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016). Os títulos de IgG no soro dos leitões foram maiores ( $p \leq 0,05$ ) durante a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semana após o início do surto, quando comparados aos títulos observados entre a 4<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semana após o aparecimento dos sinais clínicos. Por outro lado, ao longo do período observacional, não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) nos títulos de IgG entre leitões provenientes de matrizes com ou sem sinais clínicos. Entretanto são escassos os estudos com base no período de viremia e excreção do *Senecavirus A* em suínos natural ou experimentalmente infectados, bem como no potencial de atividade neutralizante de anticorpos anti-VP1 do *Senecavirus A*, sendo necessárias informações adicionais para a abordagem apropriada sobre a imunidade induzida pela infecção.

## 1.7 DIAGNÓSTICO

Os poucos estudos já realizados com o objetivo de diagnóstico do *Senecavirus A* utilizaram, principalmente, a técnica molecular de RT-PCR. Knowles e Hallenbeck (2005) descreveram a técnica da *pan*-PCR como sendo de grande valor para a identificação inicial de novos candidatos de picornavírus. Entretanto, a técnica torna-se dispendiosa devido ao

número de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) necessários para o seu desenvolvimento, especialmente aqueles com bases degeneradas e/ou alternativas.

Outras técnicas de RT-PCR convencionais foram estabelecidas e tiveram como alvo para amplificação regiões conservadas do genoma viral, como a 5'UTR e os genes VP1 (LEME et al., 2015; WANG et al. 2016) e 3D (WANG et al. 2016) do *Senecavirus A*. Adicionalmente, a RT-PCR quantitativa, tanto com *SYBR Green* quanto 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., 2016a, 2016b), e o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) (FOWLER et al., 2017; JOSHI et al., 2016b, MONTIEL et al., 2016; VANNUCCI et al., 2015) também são metodologias alternativas utilizadas para a detecção e/ou quantificação do RNA do *Senecavirus A*. Ambas as técnicas têm mostrado serem rápidas, específicas e sensíveis, permitindo o diagnóstico a partir de diferentes tipos de amostras biológicas; entretanto esses métodos são de alto custo e exigem equipamentos diferenciados e conhecimento técnico especializado para a sua execução, o que pode representar fatores limitantes para a sua implementação na rotina diagnóstica de laboratórios veterinários.

Técnicas sorológicas de diagnóstico para o *Senecavirus A* também já foram descritas, incluindo ELISA indireto (GIMENEZ-LIROLA et al., 2016; YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012), ELISA competitivo (YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012) e IFI (GUO et al., 2016; JOSHI et al., 2016a, 2016b; MONTIEL et al., 2016; YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012). As técnicas foram desenvolvidas utilizando anticorpos monoclonais para o *Senecavirus A* ou com a proteína VP1 recombinante do vírus.

A VN é outra técnica possível de ser empregada para o diagnóstico da infecção pelo *Senecavirus A* (JOSHI et al., 2016b; YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012.); a realização dessa técnica depende da utilização de cultivo celular e de vírus infectivo e com título conhecido. A leitura do resultado final da VN pode ser realizada após 2 a 3 dias de incubação.

A hibridização *in situ* e a imunohistoquímica com anticorpos monoclonais também são técnicas já estabelecidas e utilizadas por diferentes pesquisadores (JOSHI et al., 2016b; LEME et al., 2016a, 2016b; YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012). Entretanto, hibridização *in situ*, imunohistoquímica, ELISA competitivo e VN são metodologias menos utilizadas na rotina laboratorial em relação às demais técnicas moleculares e sorológicas disponíveis.

Independentemente da técnica diagnóstica a ser utilizada o médico veterinário deve estar sempre atento para a ocorrência de doenças vesiculares em animais de produção, pois todas são de comunicação obrigatória. Com isso, o profissional deve imediatamente relatar os sinais clínicos e lesões aos órgãos de defesa sanitária animal local e regional para que outros testes diagnósticos diferenciais oficiais, especialmente para a febre aftosa, possam ser realizados e assim as medidas cabíveis em cada situação específica possam ser imediatamente adotadas (ZANELLA; MORÉS, 2015).

## **1.8 CONTROLE E PROFILAXIA**

Atualmente não existem vacinas disponíveis no mercado para a profilaxia da infecção pelo *Senecavirus A*. Com isso, o manejo sanitário deve incluir medidas de controle e profilaxia que envolva tanto a granja quanto os animais e o ambiente. As medidas devem ser conduzidas com o objetivo principal de evitar a introdução do agente etiológico nos rebanhos e, naqueles rebanhos onde a infecção já tenha se estabelecido, evitar a disseminação do agente infeccioso entre os demais animais das distintas categorias presentes no mesmo lote/rebanho.

A introdução de um agente infeccioso em uma unidade de produção pode ser prevenida por meio da adoção de medidas rígidas de biossegurança. A entrada de veículos, pessoas, animais e alimentos na unidade de produção deve ser controlada com muito rigor (ZANELLA; MORÉS, 2015). A área de circulação de veículos, de um modo geral, em torno da granja deve ser limitada a áreas afastadas dos barracões onde os animais ficam alojados. O transporte de animais deve ser realizado, preferencialmente, sempre pelos mesmos veículos. No caso de reposição de animais, o ideal é que sejam adquiridos de granjas livres dos agentes infecciosos de importância em sanidade suinícola e mantidos em quarentena antes de sua incorporação ao rebanho.

Nas granjas já positivas para o *Senecavirus A*, além das medidas anteriormente citadas, devem ser adotadas a limpeza e desinfecção rigorosas das instalações e equipamentos, a adoção de vazio sanitário e de sistema *all in-all out* (ZANELLA; MORÉS, 2015). A eficácia de desinfetantes contra o *Senecavirus A* ainda não é bem conhecida. Uma vez que os sinais clínicos ocasionados pela infecção pelo *Senecavirus A* são muito semelhantes àqueles causados pelo vírus da febre aftosa, os cuidados devem ser tomados considerando a possibilidade de circulação do vírus da febre aftosa, incluindo os protocolos de desinfecção.

Isso inclui o uso de hidróxido de sódio, carbonato de sódio, ácido cítrico a 0,2%, aldeídos e agentes oxidantes, como o hipoclorito de sódio, entre outros. Três desinfetantes a base de água sanitária<sup>1</sup>, derivados fenólicos<sup>2</sup> e composto quaternário de amônia e aldeído<sup>3</sup> que têm sido utilizados contra o *Senecavirus A* foram avaliados em cinco diferentes superfícies, como cimento, borracha, plástico, aço inoxidável e alumínio e em diferentes temperaturas (4°C e ≈25°C) (GOYAL, 2015). Os resultados mostraram que a água sanitária diluída na proporção 1:20 (hipoclorito de sódio 5,25%) foi eficaz na inativação do vírus em qualquer temperatura e em qualquer uma das cinco superfícies avaliadas. O desinfetante a base de derivados fenólicos não foi efetivo contra o vírus em qualquer uma das temperaturas, enquanto os resultados obtidos a partir do desinfetante a base de composto quaternário de amônia e aldeído ficaram entre o hipoclorito de sódio e aquele composto por derivados fenólicos (GOYAL, 2015).

O peróxido de hidrogênio acelerado (*accelerated hydrogen peroxide*<sup>®</sup> - AHP<sup>®</sup>) é outro composto químico que tem sido testado como desinfetante de amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus (HOLE et al. 2016). Desinfetantes contendo AHP<sup>®</sup> mostraram atividade virucida contra algumas viroses de humanos e animais, como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o calicivírus felino e o poliovírus, que também pertence à família *Picornaviridae*. Em 2016 foi demonstrado que o AHP<sup>®</sup> é um desinfetante efetivo contra os vírus da febre aftosa, doença vesicular suína e *Senecavirus A*; entretanto a sua eficácia é dependente da diluição (1:20) e do período de contato (10 min), acima das recomendações do fabricante (HOLE et al., 2016).

O monitoramento da circulação do agente infeccioso deve ser realizado por meio de exames diagnósticos periódicos conduzidos em amostras biológicas de animais sintomáticos e assintomáticos dos diferentes sítios da unidade de produção. Além dos testes sorológicos, podem ser realizados os testes moleculares e/ou de imunohistoquímica a partir de líquido vesicular, fluido oral e fragmentos de órgãos/tecidos de leitões neonatos, especialmente tonsila, coração, pulmão, rins e vesícula urinária (JOSHI et al., 2016b, LEME et al., 2016a,b). O uso de animais sentinelas, ou seja, a introdução de suínos suscetíveis na granja também pode ser adotada, desde que com muito critério. Para animais de maternidade, especialmente leitões com até uma semana de idade, deve-se garantir a ingestão de colostro de qualidade em

---

<sup>1</sup> Hipoclorito de sódio.

<sup>2</sup> P-amilfenol-terciário (4%); O-benzil-p-clorofenol (10%); O-fenilfenol (12%).

<sup>3</sup> Amônia quaternária (26%); Glutaraldeído (7%).

quantidade adequada e um ambiente apropriado que proporcione conforto e bem-estar aos recém-nascidos e às matrizes.

Um estudo conduzido nos EUA com o objetivo de avaliar medidas de biossegurança e de entrada da infecção em uma granja suinícola sugeriu que, entre os eventos que, hipoteticamente, representaram alto risco de introdução de novo patógeno na granja estavam os trabalhadores, a movimentação interna de pessoal e o acesso de animais domésticos e roedores às áreas de alojamento dos suínos (CANNING et al., 2016). Outro estudo realizado em granjas com e sem sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* identificou e/ou isolou o RNA viral a partir de amostras de roedores e moscas domésticas capturados nas granjas, sendo ambos considerados potenciais vias de introdução e/ou disseminação do vírus para os rebanhos (JOSHI et al., 2016a). Embora a extensão da transmissão do *Senecavirus A* a partir de outros animais não seja conhecida, o controle de roedores, moscas e a limitação do acesso de animais domésticos às áreas de criação dos suínos podem se constituir em importantes medidas de controle e prevenção da infecção.

## 1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em 2012, a Associação de Saúde Animal dos EUA (*United States Animal Health Association* – USAHA) elaborou uma resolução na qual o *Senecavirus A* e a doença vesicular idiopática suína foram incluídos como importantes focos de estudos, particularmente devido aos sinais clínicos semelhantes com os da febre aftosa. A USAHA sugeriu ainda o desenvolvimento e implementação de planos para minimizar as consequências de lesões vesiculares não associadas às doenças exóticas de animais encontrados em suínos daquele país, reforçando a importância sanitária e econômica deste patógeno como causador de uma potencial doença emergente em suínos (USAHA, 2012). Em 2016, o Departamento de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agriculture* – USDA) divulgou uma lista de recomendações, procedimentos e responsabilidades no manejo de propriedades suspeitas de apresentarem a circulação do *Senecavirus A* no sentido de garantir que investigações por doenças exóticas de animais ocorram adequadamente e visando medidas de prevenção de disseminação de doenças de comunicação obrigatória (USDA, 2016).

No Brasil, em Julho de 2015, o Departamento de Saúde Animal (DSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Circular nº

018/2015/CGI/DIPOA/DAS (Anexo 7.1) com orientações de procedimentos a serem adotados frente a quadros clínicos de lesões vesiculares em suínos. O documento também orienta os veterinários dos Departamentos de Inspeção Federal sobre como proceder nos casos de abate de lote de suínos que apresentam animais com lesões suspeitas (BRASIL, 2015). Contudo, com o propósito de evitar interpretações incorretas com relação às condutas a serem adotadas é fundamental a padronização de procedimentos dentro e entre as unidades produtoras de suínos (ZANELLA; MORÉS, 2015).

O *Senecavirus A* é um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira e ainda pouco se conhece sobre as suas propriedades biológicas e sobre a sua epidemiologia. Assim, estudos adicionais sobre a infecção por esse vírus, tanto em condições naturais quanto experimentais, são necessários para elucidar aspectos importantes da fisiopatogenia da infecção, bem como propor medidas efetivas de controle e profilaxia da doença.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- BAKER, K. L., MOWRER, C., CANON, A., LINHARES, D. C. L., RADEMACHER, C., KARRIKER, L. A., HOLTKAMP, D. J. Systematic epidemiological investigations of cases of Senecavirus A in US swine breeding herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, p. 11–18, 2017.
- 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. **Circular nº18/2015/CGI/DIPOA/DAS, de 07 de Julho de 2015**. Estabelece orientação de procedimentos a serem adotados frente a lesões vesiculares e, suínos.
- 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.
- FLATHER, D., SEMLER, B. L. Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 594, 2015.

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**, doi:10.1128/JCM.00710-16.

GOYAL, S. M. **Evaluation of disinfectants against Seneca Valley virus**. Disponível em: <<http://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2016/03/15-187-Goyal-Evaluation-of-disinfectants-against-Seneca-Valley-virus.pdf>>. Acesso em: 07 de Junho de 2016.

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.

HAUSE, B. M., MYERS, O., DUFF, J., HESSE, R. A. Senecavirus A in pigs, United States, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1323-1325, 2016.

HELLEN, C. U., DE BREYNE, S. A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination. **Journal of Virology**, v. 81, p. 5850-5863, 2007.

HOLE, K., AHMADPOUR, F., KRISHNAN, J., STANSFIELD, C., COPPS, J., NFON, C. Efficacy of Accelerated Hydrogen Peroxide<sup>®</sup> disinfectant on foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus and Senecavirus A. **Journal of Applied Microbiology**, 2016. doi:10.1111/jam.13361.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. **Virus taxonomy: 2015 release**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 01 de Junho de 2016.

ISID. International Society for Infectious Diseases. **Vesicular disease, porcine UK (N. Ireland): not FMD, SVD**. ProMED-mail. Disponível em: <<http://www.promedmail.org/direct.php?id=6471>>. Acesso em: 08 de Fevereiro de 2015.

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., DIEL, 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., DIEL, 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., HALLENBECK, P. L. 2006. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. EUROPIC 2006: **XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses**. European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saariselkä, Inari, Finland, p. G2.

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. e ALFIERI, A. A. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 603-611, 2015.

LEME, R. A., OLIVEIRA, T. E. S., ALCÂNTARA, B. K., HEADLEY, S. A., ALFIERI, A. F., YANG, M. e ALFIERI, A. A. Novel 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**, 2016b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.011>.

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

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

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.
- 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.
- 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**, 2016. doi:10.1177/0300985816653990.
- 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. **21<sup>st</sup> 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.
- USAHA - UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION. **Committee on transmissible diseases of swine - Research on Seneca Valley Virus**. 2012. Disponível em: < <http://www.usaha.org/Portals/6/Resolutions/2012/resolution14-2012.pdf> >. Acesso em: 21 de Março de 2015.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Veterinary Service Guidance (7406.2) - Recommendations for Swine with Potential Vesicular Disease**. Disponível em: < [https://www.aasv.org/documents/VSG7406.2\\_SVA\\_Guidelines\\_4516.pdf](https://www.aasv.org/documents/VSG7406.2_SVA_Guidelines_4516.pdf) >. Acesso em: 25 de junho de 2016.
- 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.

ZANELLA, J. R. C., MORÉS, N. **Perdas neonatais epidêmicas transientes e doença vesicular associada com infecção com o Seneca Valley virus (Senecavirus A)**. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1040626> >. Acesso em: 09 de Julho de 2016.

ZHANG, J., PINEYRO, P., CHEN, Q., ZHENG, Y., LI, G., RADEMACHER, C., DERSCHIED, R., GUO, B., YOON, K. J., MADSON, D., GAUGER, P., SCHWARTZ, K., HARMON, K., LINHARES, D. e 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 a ocorrência de infecção natural pelo *Senecavirus A* em suínos de diferentes categorias de produção provenientes de granjas com e sem histórico de surto de doença vesicular dos principais estados brasileiros produtores de suínos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir um conjunto de *primers* específico e padronizar a técnica de RT-PCR para a detecção de RNA do *Senecavirus A*.
- Padronizar a técnica de imunohistoquímica para a detecção de antígenos específicos do *Senecavirus A* em diferentes amostras de órgãos/tecidos dos animais incluídos no estudo.
- Investigar a presença do *Senecavirus A* em diferentes tipos de amostras biológicas, incluindo líquido de vesícula, swabs e raspados de lesões vesiculares rompidas/ulceradas, diferentes órgãos/tecidos e fezes de suínos de diferentes faixas etárias e provenientes de diferentes estados brasileiros.
- Investigar a ocorrência de lesões macro e microscópicas nos diferentes órgãos/tecidos de animais positivos para o *Senecavirus A*.
- Realizar o isolamento do *Senecavirus A* em cultivo celular a partir de diferentes tipos de amostras biológicas de suínos.
- Amplificar e sequenciar os fragmentos de nucleotídeos para a identificação do genoma viral a partir de amostras biológicas e para a confirmação do isolamento viral.
- Realizar análise filogenética comparativa das cepas virais encontradas com as cepas virais de referência (protótipos) disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*).



### **3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

---

**3.1 *SENECAVIRUS A*: AN EMERGING VESICULAR INFECTION IN  
BRAZILIAN PIG HERDS  
(<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12430>)**

---

## RAPID COMMUNICATION

**Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds**R. A. Leme<sup>1</sup>, E. Zotti<sup>2</sup>, B. K. Alcântara<sup>3</sup>, M. V. Oliveira<sup>1</sup>, L. A. Freitas<sup>1</sup>, A. F. Alfieri<sup>1</sup> and A. A. Alfieri<sup>1</sup><sup>1</sup> Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil<sup>2</sup> Department of Veterinary Medicine, Pontifícia Universidade Católica, Toledo, Paraná, Brazil<sup>3</sup> Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil**Keywords:**swine; *Seneca Valley virus*; vesicular skin disease; picornavirus infections**Correspondence:**A. A. Alfieri. Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário, CEP 86057-970, PO Box 10011, Londrina, Paraná, Brazil.  
Tel.: 55 43 33715876; Fax: 55 43 33714485; E-mail: alfieri@uel.br

Received for publication June 1, 2015

doi:10.1111/tbed.12430

**Summary**

Vesicular diseases are clinically and economically important infections that affect farm animals. North American studies have suggested that *Senecavirus A* infection might be associated with a vesicular disease in pigs known as porcine idiopathic vesicular disease (PIVD). In the beginning of 2015, outbreaks of porcine vesicular disease have occurred in six Brazilian states from three geographical regions. Official diagnostic tests were performed with negative results for classical vesicular diseases of compulsory reporting. This study investigated *Senecavirus A* infection in PIVD outbreaks in which other aetiological agents were ruled out. A primer set was designed to amplify a 542-bp product size of VP3/VP1 region of *Senecavirus A* genome in RT-PCR assay. Primer specificity was analysed *in silico* and in porcine biological specimens. For this, clinical specimens were collected from eight pig herds affected with PIVD, including vesicular fluid ( $n = 4$ ) and swabs ( $n = 7$ ) and scrapings of ruptured vesicles and ulcerative lesions ( $n = 5$ ) from weaned and adult pigs. Clinically healthy animals ( $n = 52$ ) of PIVD-affected and non-affected pig herds also were evaluated for *Senecavirus A* infection. The 16 samples from PIVD-affected animals were positive for *Senecavirus A* in the RT-PCR assay, while none of the clinically healthy pigs were detected with the virus. Sequencing analysis revealed high nucleotide (87.6–98.5%) and amino acid (95–99.4%) similarities to SVV-01 prototype and other *Senecavirus A* strains from North American pigs. Primer set presented herein was suitable for molecular characterization of *Senecavirus A*. The results suggest that *Senecavirus A* was the aetiological agent of the vesicular disease outbreaks in the evaluated pig herds. This is the first study to report the *Senecavirus A* infection in clinically affected pigs outside of North America. *Senecavirus A* was considered a novel emerging pathogen associated with an important vesicular disease in Brazil.

**Introduction**

*Senecavirus A*, formerly named *Seneca Valley virus* (SVV), is the single representative species of the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family. The virus was first isolated as a cell culture contaminant in 2002, and the first complete genome sequence was determined in 2005 (Knowles and Hal-lenbeck, 2005; Knowles et al., 2006; Hales et al., 2008).

*Senecavirus* is a single-stranded, positive-sense, non-enveloped RNA virus with a genome size of approximately 7.2 kb (Hales et al., 2008). The genome of *Senecavirus A* consists of three major proteins, named polyprotein 1 to 3 (P1, P2 and P3). The P1 region is cleaved into the structural polypeptides VP0, VP3 and VP1, which are proteins that compose the virus capsid. A maturation site located within the VP0 gives the VP2

and the internal VP4 polypeptide (Hales et al., 2008). The P2 region is divided into 2A, 2B and 2C, while the P3 region possesses the 3A, 3B, 3C and 3D polypeptides. Both P2 and P3 genomic regions encode non-structural proteins associated with the virus replication (Hales et al., 2008).

Outbreaks of a vesicular disease with unknown aetiology, called porcine idiopathic vesicular disease (PIVD), and that were clinically indistinguishable from other important vesicular infections, such as foot-and-mouth disease (FMD), vesicular stomatitis (VS) and swine vesicular disease (SVD), were reported from pigs of North America. The PIVD was reported in pigs from the USA (Amass et al., 2004; Singh et al., 2012), and Manitoba, Canada (Pasma et al., 2008). Studies performed in Canada (Pasma et al., 2008) and in the USA (Singh et al., 2012) have suggested that *Senecavirus A* infection might be associated with PIVD.

Vesicular diseases in farm animals always receive special attention due to their clinical, economic and epidemiological importance. This study reports the first molecular detection of *Senecavirus A* in outbreaks of PIVD from pigs of Brazil.

## Materials and Methods

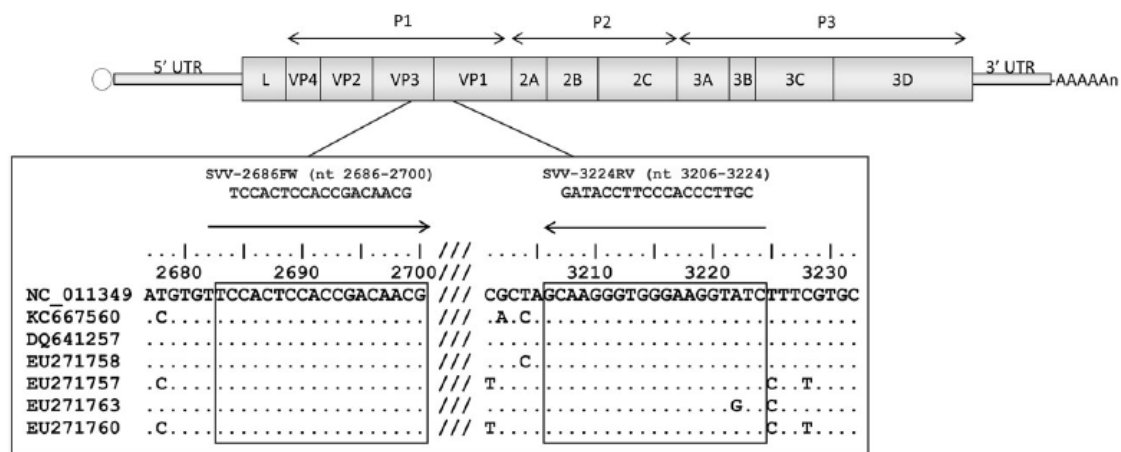
Since January 2015, pig herds from six states of the southern, south-east and midwest regions of Brazil were affected with a vesicular disease that resembled the classical vesicular infections, such as FMD, VS and SVD. The Animal Health Department (DSA) of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) was noti-

fied relative to the occurrence of the vesicular disease outbreaks from pigs. After sampling affected pig herds from different regions, the Brazilian National Agricultural Laboratory (LANAGRO) provided official tests recommended by the World Organization for Animal Health (OIE) for screening the classical vesicular infections, such as FMD, SVD and VS with negative results for all the evaluated viruses.

Based on the reported detection of *Senecavirus A* from pigs with vesicular disease (Pasma et al., 2008), we designed a study for the molecular screening of the virus. For this, a new set of primers were defined as molecular tool for reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay.

Primers SVV-2682FW (5'-TTCCACTCCACCGACAA CG-3') and SVV-3224RV (5'-GATACCTTCCCACCCTTG C-3') in this study were designed based on *Senecavirus A* nucleotide (nt) sequences available on GenBank database. The primer positions were defined based on the prototype SVV-01 (GenBank accession number: NC\_011349) complete genome sequence and were designed to amplify 542-bp nt sequence of the VP3/VP1 genomic regions (Fig. 1).

The specificity of the SVV-2682FW and SVV-3224RV primers was tested *in silico* with nt sequences of other picomaviruses, such as FMD virus types A (GenBank accession numbers: AY593752, AY593788, HQ832592), O (GenBank accession numbers: AY593829, AJ320488, JN998085), C (GenBank accession numbers: AY593810, FJ824812), SAT1 (GenBank accession number: AY593839), SAT2 (GenBank accession number: KM268897), SAT3 (GenBank accession number: AY593853) and Asia 1 (GenBank acces-



**Fig. 1.** Schematic diagram of *Senecavirus* genome organization, the correspondent genomic region target in the RT-PCR assay and alignment of *Senecavirus A* nucleotide (nt) sequences on which primer set design was based. Primer sequences are boxed. Reverse primer is the antisense complement nt sequence of the second box. Conserved nt sequences are indicated by dots. Slashes indicate hidden nt sequences within this region.

sion numbers: AY593795, AY304994, DQ989318); SVD virus (GenBank accession numbers: KF963275, AF268065, D16364); *Teschovirus A* (GenBank accession numbers: KC757344, JQ808131, AY392555, AF296103); *Sapelovirus A* (GenBank accession numbers: KJ821019, JX286666); *Enterovirus G* (GenBank accession numbers: NC\_004441, Y14459); *Aichivirus C* (GenBank accession numbers: KC424639, GU292559); *Pasivirus A* (GenBank accession numbers: JQ316470, JX491648); and *Cardiovirus* (GenBank accession numbers: KF771002, NC\_001479, AY296731, KM269482, JX683808, EU681179, DQ835185). Additionally, pig faecal samples that were previously known to be positive for other picornaviruses such as *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and/or *Enterovirus G* (Donin et al., 2014) were tested for *Senecavirus A* presence with the new primers herein.

To evaluate the primer set efficiency from biological samples, animals were sampled at the end of February 2015, when outbreaks of PIVD occurred in two pig herds located in distinct cities of Paraná state. Farm A had 5700 sows, with suckling piglets and weaned pigs <65 days of age. Farm B was an all-in/all-out finisher unit with 1400 135-day-old pigs. Approximately 2% of weaned pigs (22–65 days old,  $n \approx 460$ ) at farm A and 30% ( $n \approx 420$ ) of the total pig farm population at farm B presented clinical signs of claudication, fluid-filled and ruptured vesicles, and ulcerative lesions on the coronary band, hooves (Fig. 2) and/or snout (Fig. 3). The affected animals presented difficulty of moving and locomotion and decreased feed intake, feed conversion efficiency and daily weight gain. The clinical signs persisted in the affected animals for approximately

2 weeks and then disappeared. However, other pigs started to present similar symptoms.

From March to June, 2015, six farrow-to-weaning pig herds, identified in this study as farms C to H located in Paraná and Santa Catarina states, southern Brazil, also reported PIVD outbreaks, with adult sows presenting the same clinical history and symptoms as previously described. Sow population in these farms varied from 200 to 500 animals, and morbidity rates ranged from 20 to 90%.

Swabs ( $n = 7$ ) and scrapings of ruptured vesicles and ulcerative lesions ( $n = 5$ ), and vesicular fluids ( $n = 4$ ) were collected from weaned and adult pigs of the eight farms. To evaluate asymptomatic pigs for *Senecavirus A* infection, 14 PIVD non-affected animals within the same farms also were sampled with scrapings of skin, except for farms E and G, which did not sampled asymptomatic pigs. Sterile swabs were used for sampling clinical specimens. The ruptured vesicles and ulcerative lesions were scraped with sterile scalpel blades for each sample. Each vesicular fluid was punctured with individual sterile disposable syringe and needle. A total of 30 samples were collected from PIVD-affected farms.

Additionally, cutaneous tissue samples ( $n = 38$ ) were collected from clinically healthy pigs of five non-affected pig herds, two of which were of Paraná state and the remaining three farms were of a state that did not report outbreaks of PIVD. All the samples were kept on ice and were immediately processed upon arrival at the laboratory.

Cutaneous tissue samples were disrupted with MagNa Lysor Instrument (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany). Ruptured vesicle and ulcerative lesion scrapings



**Fig. 2.** Ruptured vesicle and ulcerative lesions on the coronary band and hooves of porcine idiopathic vesicular disease (PIVD)-affected animals of Paraná and Santa Catarina states, southern Brazil.



**Fig. 3.** Fluid-filled and ruptured vesicles on the snout of porcine idiopathic vesicular disease (PVD)-affected animals of Paraná and Santa Catarina states, southern Brazil.

and swabs and disrupted cutaneous samples were homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and clarified by centrifugation at 3000 g for 10 min. Nucleic acid was extracted from 200  $\mu$ l of proteinase K pre-treated aliquots of the vesicular fluid, scraping/swab and cutaneous tissue suspensions, using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods (Boom et al., 1990; Alferi et al., 2006). The extracted nucleic acid was eluted in 50  $\mu$ l of ultrapure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water. Sterile ultrapure water was used as a negative control in all the nucleic acid extraction and amplification procedures.

Virus isolation was performed in PK-15 cells, which were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL<sup>®</sup>, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco BRL<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA). Confluent monolayers were washed 2–3 times with replacement DMEM. Vesicular fluid suspensions pre-treated with 3 $\times$  penicillin, streptomycin and fungizone (Gibco<sup>®</sup> Antibiotic-Antimycotic) were used to inoculate cell monolayers. The virus was allowed to adsorb at 37°C for 3 h in a temperature-controlled rocker platform. The inoculated PK-15 cells were maintained in CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>, Marietta, OH, USA) and inspected daily for cytopathic effect (CPE). After two blind passages or when approximately 80% of the cells had CPEs, 1 ml of cell culture supernatant was centrifuged at 3000 g for 10 min, and virus nucleic acid was extracted from proteinase K pre-trea-

ted 200  $\mu$ l aliquots (Boom et al., 1990). Non-inoculated PK-15 cells were included as negative control.

The RT reaction was performed with a denaturation solution of 14  $\mu$ l, containing 5  $\mu$ l of extracted RNA, 2  $\mu$ l (20 pmol/ $\mu$ l) of SVV-3224RV primer and 10 mM of total dNTP, that was incubated at 65°C for 5 min and, subsequently, placed on ice for 5 min. A volume of 6  $\mu$ l of RT-mix solution containing 4  $\mu$ l of 5 $\times$  first-strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ l 0.1 M DTT and 200 U Superscript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, Eugene, OR, USA) was mixed with the product of denaturation reaction and reverse-transcribed at 55°C for 50 min, followed by an inactivation reaction at 70°C for 15 min.

The PCR assay was performed in final solution of 50  $\mu$ l containing 2  $\mu$ l of cDNA, 1 $\times$  PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM of total dNTP, 20 pmol of each primer (forward and reverse) and 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). Amplification reactions were performed in a thermocycler (Swift<sup>®</sup> MaxPro Thermal Cycler; Esco Healthcare Pte, Singapore, Singapore) at 94°C for 5 min for denaturation followed by 35 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min and 72°C/1 min and a final extension at 72°C for 7 min.

The 16 samples from PIVD-affected animals also were tested for FMD, VS and SVD viruses, by RT-PCR and nested PCR, following the OIE Terrestrial Manual (<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial->

manual/access-online/). *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and *Enterovirus G* were screened by RT-PCR assays in these samples as previously described (Krumbholz et al., 2003; Donin et al., 2014), as these picornaviruses might be associated with cutaneous lesions and were detected in pigs with vesicular diseases (Knowles, 1988; Amass et al., 2004).

Eight RT-PCR products, one for each PIVD-affected pig herd evaluated, were selected for sequencing analysis. The amplicons were purified by the PureLink<sup>®</sup> Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified by Qubit<sup>®</sup> Fluorometer (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, Eugene, OR, USA) and sequenced in both directions with forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyzer with the BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were assembled using Phred/Phrap/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence identity matrix was performed using the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A phylogenetic tree based on nt was obtained using the neighbour-joining statistical method based on maximum composite likelihood model (MEGA v. 6), which provided statistical support via bootstrapping with 1000 replicates.

## Results and Discussion

In Brazil, only official laboratories, named Brazilian National Agricultural Laboratories (LANAGROs), are authorized to manipulate animals and/or clinical samples with suspect of or positive for FMD, VS and SVD viruses, as well as to perform any diagnostic tests for screening these infections. Therefore, we only were allowed to perform our study after be sure that the pig herds were negative to compulsory vesicular diseases. Additionally, southern Brazil is considered free of FMD and VS and, therefore, these viruses cannot be introduced here. SVD has never been reported in pig herds of Brazil, as well as *Senecavirus A*, and positive samples for these viruses were not available for laboratory validation of the primer set in this study against these viruses.

The *in silico* analyses of primers in this study did not reveal annealing with any of the evaluated viruses. The RT-PCR assay with new primer set herein from faecal samples that were positive for *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and/or *Enterovirus G* did not provide amplification of non-specific products nor show cross-reaction of the primers with any of these picornaviruses. Additionally, all clinical samples

collected from asymptomatic pigs of PIVD-affected and non-affected herds did not show amplification products.

The RT-PCR analysis showed the expected 542-bp product size in all vesicular fluid, swab and scraping of the ruptured vesicle and ulcerative lesion samples. *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, *Enterovirus G*, FMD, VS and SVD virus RNA were not detected in the vesicular outbreak clinical samples. *Senecavirus A* detection according to the health status of the evaluated animals in PIVD-affected farms is presented in Table 1.

Following two sequential passages in PK-15 cells, viruses were successfully isolated from vesicular fluid samples. Forty-eight hours post-inoculation, CPEs were evident as cell lyses (Fig. 4). No CPEs were evident in the cell negative control. RT-PCR assays from inoculated cell culture supernatant detected only *Senecavirus A* and did not detect FMD, VS and SVD viruses, *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and *Enterovirus G*.

Sequencing analysis revealed that the eight amplicons were 99.6–100% nt similar to each other and presented nt similarities varying from 87.6% to 98.5% with the SVV-01 prototype and with other *Senecavirus A* strains from pigs of the USA. At the amino acid (aa) level, the *Senecavirus A* strains herein were 100% identical to each other and 95–99.4% similar to the available *Senecavirus A* sequences in GenBank. The aa sequences presented here include the VP3/VP1 cleavage site (H/S) and the STDNAETGVIEAGNTDITDFSGELAAP VP1 polypeptide (Hales et al., 2008) (Fig. 5).

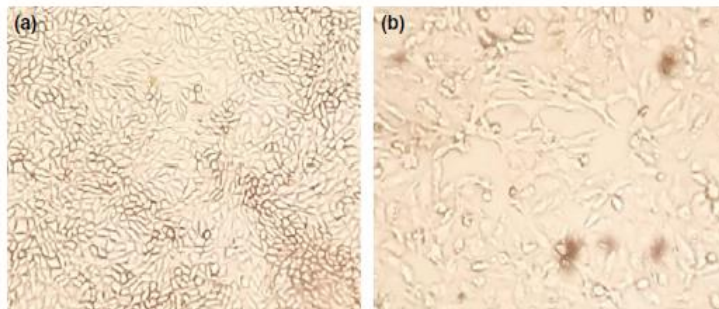
The phylogenetic tree (Fig. 6) constructed from picornaviruses related to vesicular diseases formed well-defined clusters representative of picornavirus species. The Brazilian strains in this study were represented by sequences named BRA/UEL-SVV-A1/15, GenBank accession number: KR075677; and BRA/UEL-SVV-B2/15, GenBank accession number: KR075678, which grouped together with *Senecavirus*, revealing the homology between *Senecavirus A* nt sequences in this study and other published sequences of this virus.

A study based on the *Senecavirus A* complete genomic analysis showed that the P1 genomic region presents protease cleavage sites that predict the VP2, VP3 and VP1 polypeptides (Hales et al., 2008). The *Senecavirus A* VP1 region encodes a capsid protein and is naturally exposed to higher selection pressure than the conserved genomic regions. The 3' end genomic region of picornaviruses is well conserved and, when combined with the phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene (3D<sup>Pol</sup>), have been reported as useful for classifying unknown viruses within a species. However, a suitable classification has to be performed based on other genomic regions, such as the VP1 or P1 sequencing (Knowles, 2005).

**Table 1.** *Senecavirus A* detection by RT-PCR assay in porcine idiopathic vesicular disease (PVD)-affected pig farms of southern Brazilian region according to the health status of the evaluated animals

Farm identity	Brazilian state of origin	Pig identity	PVD status of the animal	Sample type	<i>Senecavirus A</i>
Farm A	Paraná	FA1	Affected	Scraping of ruptured vesicle on the snout	+
			Affected	Scraping of ulcerative lesion on the hoof	+
		FA2	Affected	Scraping of ulcerative lesion on the hoof	+
			Affected	Scraping of ruptured vesicle on the snout	+
Farm B	Paraná	FA4	Non-affected	Scraping of asymptomatic forelimb skin	–
			Affected	Vesicular fluid	+
		FB1	Affected	Vesicular fluid	+
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
Farm C	Paraná	FC1	Affected	Swab of vesicles on the snout	+
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
		FC2	Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
		FC3	Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the hoof	–
Farm D	Paraná	FD1	Affected	Vesicular fluid	+
			Affected	Scraping of ulcerative lesions on the forelimbs	+
		FD2	Non-affected	Scraping of asymptomatic forelimb skin	–
			Affected	Scraping of ulcerative lesion on the hoof	+
Farm E	Paraná	FE1	Affected	Scraping of ulcerative lesion on the hoof	+
Farm F	Santa Catarina	FF1	Affected	Swab of vesicles on the snout	+
			Affected	Swab of vesicles on the snout	+
		FF2	Affected	Swab of vesicles on the hoof	+
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the hoof	–
		FF3	Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the hoof	–
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the hoof	–
		FF4	Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
Affected	Swab of vesicles on the snout		+		
Farm G	Santa Catarina	FG1	Affected	Swab of vesicles on the snout	+
Farm H	Santa Catarina	FH1	Affected	Vesicular fluid	+
			Affected	Swab of vesicles on the snout	+
		FH2	Affected	Swab of vesicles on the snout	+
			Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–
		FH3	Non-affected	Scraping of asymptomatic skin on the snout	–

PVD, porcine idiopathic vesicular disease.



**Fig. 4.** (a) PK-15 monolayer – negative control; (b) cytopathic effect after 48 h post-inoculation.

The primers designed in this study targeted the nt sequence upstream of the featured VP1 polypeptide, including the VP3/VP1 cleavage site (H/S). Sequencing and phylogenetic analyses revealed that *Senecavirus A* Brazilian strains were closely related to North American

senecaviruses. Therefore, this study presents a *Senecavirus A*-specific VP3/VP1 primer set, which shows that this is a useful genomic region for molecular screening of *Senecavirus A* infection and for characterization of the virus.

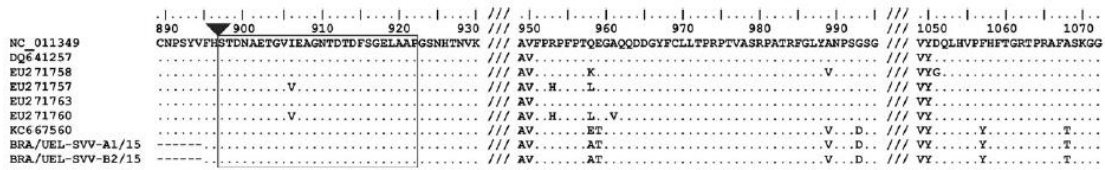


Fig. 5. Alignment of amino acid (aa) sequences of *Senecavirus A* strains available in GenBank and sequences in this study. The VP3/VP1 cleavage site is indicated by arrow. The *Senecavirus A* VP1 polypeptide is boxed. Conserved aa sequences are indicated by dots. Slashes indicate hidden conserved aa sequences within this region.

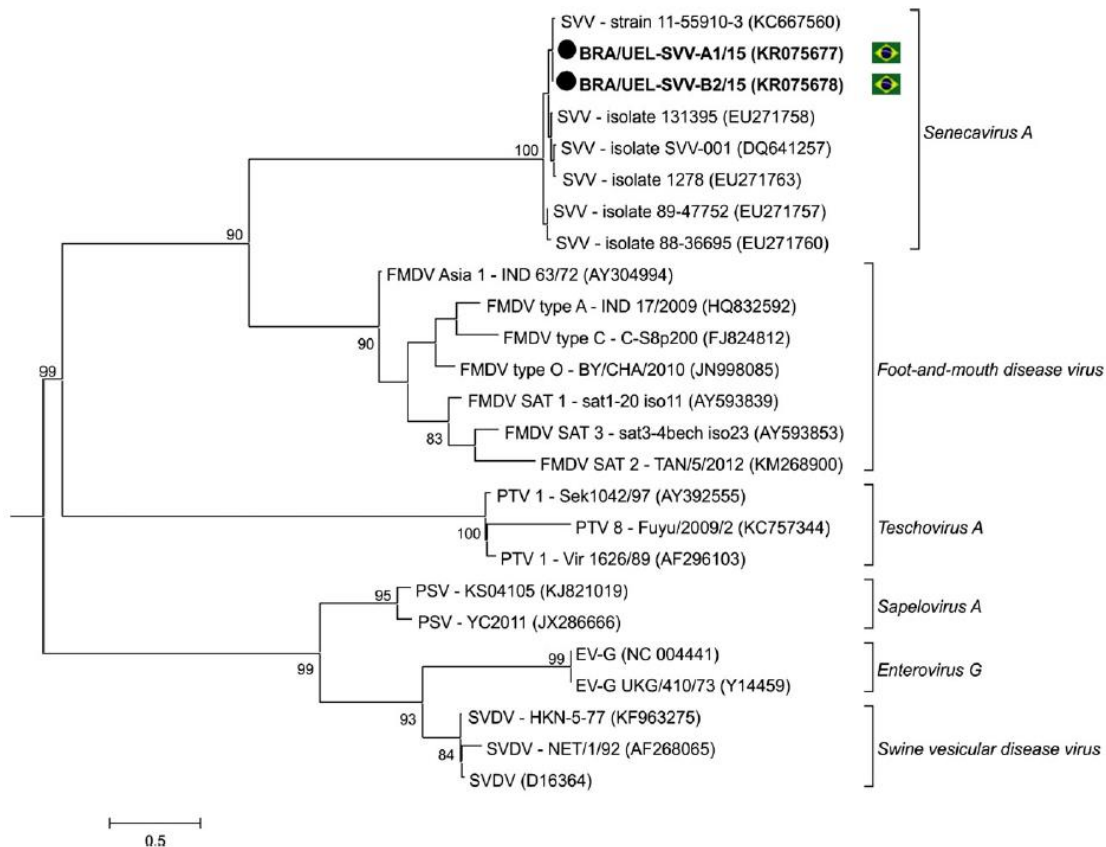


Fig. 6. Genetic relationship of *Senecavirus A* Brazilian nucleotide sequences and other published sequences which represent picornavirus species related to vesicular disease. Neighbour-joining phylogenetic tree construction using the maximum composite likelihood model. Bootstrap values were determined in 1000 replications. GenBank accession numbers of representative sequences and *Senecavirus A* Brazilian strains (●BRA/UEL-SVV-A1/15 and ●BRA/UEL-SVV-B2/15) herein are indicated between parentheses.

The targeted genomic region (VP1) in this study is more unstable than the 3D<sup>pol</sup> gene and the 3' end of the senecavirus genome; therefore, a higher sequence variation was expected (Knowles, 2005; Hales et al., 2008). However, *Senecavirus A* nt/aa sequences in this study were highly similar to each other, even derived

from different biological (ruptured vesicles/ulcerative lesion scraping, swab and vesicular fluid) samples from animals at different ages and from distinct pig farms. To our knowledge, outbreaks of PIVD started in Brazil from the south-east region in January and, soon later, reached pig herds of the midwest Brazilian region. Southern Bra-

zil was affected by the disease in the end of February 2015, initially in Paraná state, and in March we knew about the disease occurrence in Santa Catarina state. Based on the similar clinical history of PIVD reported from farms of different regions of Brazil, it is likely that the same *Senecavirus A* strain was circulating within the affected pig herds.

Infections with viruses that cause vesicular diseases, such as FMD, VS and SVD, were excluded after official diagnostic tests were performed by the national reference laboratory. Low virulence strains of FMD, VS or SVD viruses were ruled out after negative results from specific RT-nested-PCR assays. Pig herds in Brazil are not vaccinated against FMD, VS or SVD, which are viruses that cause highly contagious vesicular infections. If one of these viruses was the causative agent of the PIVD outbreaks herein reported, rapid dissemination throughout the pig herds would have resulted. Furthermore, neighbouring livestock farms would have had their herds affected by FMD, VS or SVD infection and, in the regard to FMD and VS viruses, would have included herds of other animal species; however, these infections have not been reported. Therefore, classical viral vesicular diseases also were epidemiologically excluded as the causative agents of these outbreaks.

Other porcine picornaviruses that might be associated with cutaneous lesions and have been previously reported in Brazilian pig herds (Donin et al., 2014) were not detected in this study. Based on the negative results for important porcine vesicular disease viruses, the outbreak epidemiology, and the *Senecavirus A* RNA detection and isolation, this porcine picornavirus is strongly considered to be the causative agent of the vesicular disease outbreaks in these pig herds. This statement is reinforced by the results from the cutaneous tissue samples of clinically healthy animals in PIVD-affected and non-affected pig herds, which did not reveal the *Senecavirus A* presence.

Outside of North America, outbreaks of porcine vesicular disease of unknown aetiology were reported in Australia (Munday and Ryan, 1982), New Zealand (Montgomery et al., 1987), United Kingdom (ISID, 2007) and Italy (Sensi et al., 2010). However, *Senecavirus A* infection was not investigated in the above-mentioned outbreaks; in the first two studies certainly due to event time, however, we cannot assert about the reasons for this virus had not been investigated in the United Kingdom and Italy. Moreover, we had access to limited information in the regard to the outbreaks in these two last countries (ProMED-mail post and Congress proceedings, respectively) and, therefore, it is not possible to perform an appropriate approach of these cases.

To the author's knowledge, there is no previous history suggestive of PIVD in Latin America and this study likely represents the first attempt to investigate *Senecavirus A* in this American region. There are only two North American

studies that reported *Senecavirus A* detection in PIVD-affected animals. In the first one, a group of 187 pigs were screened for virus infections; however, it was not described the number of positive animals for *Senecavirus A* (Pasma et al., 2008). The second study evaluated an isolated case of PIVD from a single pig at 6 months old (Singh et al., 2012). This Brazilian study evaluated eight PIVD-affected pig herds from two different states of the southern region of the country, and in all of them, *Senecavirus A* was detected only in animals with clinical signs. Additionally, the virus was successfully isolated from the vesicular fluid, evidencing that *Senecavirus A* virions were present in clinical samples.

In conclusion, this study represents the first report of *Senecavirus A* infection outside of North America. Vesicular diseases in farm animals are clinically, economically and epidemiologically important problems. Due to the highly contagious feature of FMD, this was the first disease for which the OIE established an official list of free countries and zones. The SVD, VS and vesicular exanthema of swine present clinical signs similar to FMD, including vesicular lesions, and are grossly and clinically indistinguishable of the FMD virus infection. Therefore, these viruses were also included in the OIE-listed diseases. In 2012, the United States Animal Health Association determined a resolution in which *Senecavirus A* and PIVD are the main subjects due to the similar clinical signs with FMD and in order to develop and implement plans to minimize the consequences of vesicular lesions not associated with foreign animal diseases found in pigs of that country (USAHA, 2012), reinforcing the health and economic importance of these newly emerging pathogen and disease of swine.

*Senecavirus A* may be an emerging causative agent of vesicular disease, and this virus should be included in the differential diagnostic for the classical viral vesicular diseases, even though the *Senecavirus A* infection is milder and does not have elevated economic impacts. The novel primer set reported in this study was suitable for the rapid molecular detection of the *Senecavirus A*, and it may represent a novel tool for studies based on the molecular epidemiology and evolution of this virus.

#### Acknowledgements

The authors thank Dalmo Martins Leturiondo for sending images of PIVD-affected animals, and the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council 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 Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Alcântara, B.K. and de Arruda Leme, R. are recipients of CNPq fellowships.

### Conflict of Interest

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

### References

- Alfieri, A. A., M. E. Parazzi, E. Takiuchi, K. C. Médiçi, and A. F. Alfieri, 2006: Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521–526.
- Amass, S. F., J. L. Schneider, C. A. Miller, S. A. Shawky, G. W. Stevenson, and M. E. Woodruff, 2004: Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. *J. Swine Health Prod.* 12, 192–196.
- Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa, 1990: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Donin, D. G., R. de Arruda Leme, A. F. Alfieri, G. C. Alberton, and A. A. Alfieri, 2014: First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 523–528.
- Hales, L. M., N. J. Knowles, P. S. Reddy, L. Xu, C. Hay, and P. L. Hallenbeck, 2008: Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.* 89, 1265–1275.
- International Society for Infectious Diseases (ISID), 2007: Vesicular disease, porcine UK (N. Ireland): not FMD, SVD. Archive number 20070110.0099. ProMED-mail. Available at: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=6471> (accessed February 8, 2015).
- Knowles, N. J. 1988: The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. *Vet. Rec.* 122, 441–442.
- Knowles, N. J. 2005: A pan-RT picornavirus RT-PCR: identification of novel picornavirus species. EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 23–29th May; Lunteren, The Netherlands: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, p. A06.
- Knowles, N. J., and P. L. Hallenbeck. 2005: A new picornavirus is most closely related to cardiaviruses. EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 23–29th May; Lunteren, The Netherlands: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; p. A14.
- Knowles, N. J., L. M. Hales, B. H. Jones, J. G. Landgraf, J. A. House, K. L. Skele, K. D. Burroughs, and P. L. Hallenbeck. 2006: Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. EUROPIC 2006: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 26th November–1st December; Saariselkä, Inari, Finland: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; p. G2.
- Krumbholz, A., R. Wumm, O. Scheck, E. Birch-Hirschfeld, R. Egerer, A. Henke, P. Wutzler, and R. Zell, 2003: Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods* 113, 51–63.
- Montgomery, J. F., R. E. Oliver, and W. S. H. Poole, 1987: A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease I. Field cases. *N. Z. Vet. J.* 35, 21–26.
- Munday, B. L., and F. B. Ryan, 1982: Vesicular lesions in swine – possible association with the feeding of marine products. *Aust. Vet. J.* 59, 193.
- Pasma, T., S. Davidson, and S. L. Shaw, 2008: Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.* 49, 84–85.
- Sensi, M., A. Catalano, M. Tinaro, C. Mariotti, C. Panziera, S. Marchi, and S. Costarelli. 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., S. Corner, S. G. Clark, G. Scherba, and R. Fredrickson, 2012: Seneca Valley Virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J. Vet. Sci. Technol.* 3, 1–3.
- USAHA, United States Animal Health Association, 2012: Committee on transmissible diseases of swine – Research on Seneca Valley Virus. Available at: <http://www.usaha.org/Portals/6/Resolutions/2012/resolution14-2012.pdf> (accessed March 21, 2015).

**3.2 CLINICAL MANIFESTATIONS OF *SENECAVIRUS A* INFECTION IN  
NEONATAL PIGS, BRAZIL, 2015  
(<https://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151583>)**

---

Vol 22, No 7, July 2016

# EMERGING INFECTIOUS DISEASES®



Zoonoses

July 2016

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

Pages 1149-1332

Artist Unknown, **Hercules and the Erymanthian Boar**, mid-17th century, Bronze, with red brown lacquer patina. Height: 17 1/8 in / 44.5 cm. Metropolitan Museum of Art, New York, New York; The Jock and Belle Linsky Collection, 1982.



# EMERGING INFECTIOUS DISEASES®

July 2016

## Restaurant Cooking Trends and Increased Risk for *Campylobacter* Infection ..... 1208

A.K. Jones et al.

Perceived consumer preferences for rare chicken liver are increasing risk for campylobacteriosis.

## Heat Wave–Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014..... 1216

C. Baker-Austin et al.

Emergence in high-latitude regions requires improved diagnostic detection, and clinical awareness.

## High Incidence of Chikungunya Virus and Frequency of Viremic Blood Donations during Epidemic, Puerto Rico, USA, 2014..... 1221

G. Simmons et al.

Deaths were rarely observed, but newborns and other vulnerable populations are at risk for severe complications.

## *Tropheryma whipplei* as a Cause of Epidemic Fever, Senegal, 2010–2012..... 1229

H. Bassene et al.

Findings suggest that the bacterium has a role in febrile episodes, is contagious, and has an epidemic character.

## Dispatches

### 1235 Outbreak of *Vibrio* *parahaemolyticus* Sequence Type 120, Peru, 2009

N. Gonzalez-Escalona et al.

### 1238 Clinical Manifestations of Senecavirus A Infection in Neonatal Pigs, Brazil, 2015

R.A. Leme et al.

### 1242 Infection with Possible Novel Parapoxvirus in Horse, Finland, 2013

N. Airas et al.

### 1246 Vesicular Disease in 9-Week- Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A

N. Montiel et al.

### 1249 Hepatitis E Virus in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates and Pakistan, 1983–2015

A. Rasche et al.



p. 1239

p. 1243



### 1253 Increased Mortality Rates Associated with *Staphylococcus aureus* and Influenza Co-infection, Maryland and Iowa, USA

J.S. McDanel et al.

### 1257 Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Strains, the Netherlands

A. Liakopoulos et al.

### 1262 Identification of *Streptococcus suis* Meningitis through Population-Based Surveillance, Togo, 2010–2014

H. Tall et al.

### 1265 Postbooster Antibodies from Humans as Source of Diphtheria Antitoxin

J.F. Bermejo-Martin et al.

### 1268 Travel-Associated Rabies in Pets and Residual Rabies Risk, Western Europe

F. Ribadeau-Dumas et al.

### 1272 Natural Norovirus Infections in Rhesus Macaques

T. Farkas

### 1275 Red Fox as a Sentinel for *Blastomyces dermatitidis*, Ontario, Canada

N.M. Nemeth et al.

### 1278 Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Wild Birds during Outbreaks in Domestic Poultry, Minnesota, USA, 2015

C.S. Jennelle et al.

### 1283 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and Generation of Novel Reassortants, United States, 2014–2015

D.-H. Lee et al.

## Clinical Manifestations of Senecavirus A Infection in Neonatal Pigs, Brazil, 2015

Raquel A. Leme,<sup>1</sup> Thalita E.S. Oliveira,<sup>1</sup>  
Brígida K. Alcântara, Selwyn A. Headley,  
Alice F. Alfieri, Ming Yang, Amauri A. Alfieri

We identified new clinical manifestations associated with Senecavirus A infection in neonatal piglets in Brazil in 2015. Immunohistochemical and molecular findings confirmed the association of Senecavirus A with these unusual clinical signs and more deaths. Other possible disease agents investigated were not associated with these illnesses.

Senecavirus A (SVA), formerly called Seneca Valley virus, is the single representative species of the genus *Senecavirus* (family *Picornaviridae*). SVA is a single-stranded, positive-sense, nonenveloped RNA virus with a genome size of  $\approx 7.2$  kb (1).

SVA infection was associated with porcine idiopathic vesicular disease (PIVD) in pigs in Canada (2), the United States (1), and Brazil (3,4). The clinical manifestations of PIVD are indistinguishable from those of other vesicular virus infections, including foot-and-mouth disease virus (FMDV), vesicular stomatitis virus, swine vesicular disease virus (SVDV), and vesicular exanthema of swine virus (2,3). These clinical signs include fluid-filled and ruptured vesicles and ulcerative lesions at the coronary band, hooves, and/or snout (1–4). In 2015, we identified new clinical manifestations associated with SVA infections in piglets in Brazil.

### The Study

Since early 2015, increased numbers of deaths were recorded in pig herds from different geographic regions of Brazil. Piglets during their first week of life demonstrated clinical signs such as muscular weakness, lethargy, excessive salivation, cutaneous hyperemia, neurologic manifestations, and diarrhea; some died suddenly. Clinical signs lasted for 3–10 days and then disappeared in piglets that survived.

To determine the cause of these illnesses, we investigated 5 farms (A–E). Pig populations per farm varied from 10,000 to 23,000 animals, and piglet death rates during the first week of life ranged from 20% to 30%. Ten piglets that died spontaneously were examined (Table 1).

Author affiliations: Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil (R.A. Leme, T.E.S. Oliveira, B.K. Alcântara, S.A. Headley, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri); National Centre for Foreign Animal Disease, Winnipeg, Manitoba, Canada (M. Yang)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.151583>

Farms A, B, D, and E had gestating and/or farrowing sows with fluid-filled or ruptured vesicles at the coronary bands, hooves, or snouts; reproductive disorders were not observed. We had identified SVA RNA from sows at farms A and B (3) a week before the onset of clinical manifestations in these piglets.

Routine necropsies of all piglets were conducted soon after death. Tissues were fixed by immersion in 10% buffered formalin solution and processed for histopathologic evaluation. Selected tissue fragments were used in an immunohistochemical (IHC) assay designed with monoclonal antibodies to detect SVA (5). Duplicate sections of the organs and scrapings from oral vesicles and cutaneous lesions were collected for molecular diagnostics. From piglets at farms C, D, and E, we collected diarrheic fecal samples to investigate the possibility of enteric viruses. We analyzed 81 tissue samples and 6 diarrheic fecal samples during this study by a combination of pathologic and molecular diagnostic methods.

Molecular assays were conducted to identify viruses that might be associated with the reported clinical signs; these included SVA (3); FMDV, vesicular stomatitis virus, and SVDV (6); teschovirus A, sapelovirus A, and enterovirus G (7); porcine parvovirus (8); and porcine circovirus type 2 (9). Feces and fragments of the small intestine from piglets of farms C, D, and E were evaluated for porcine rotavirus species A, B, C (10), and H (11); porcine epidemic diarrhea virus (12); swine deltacoronavirus (13); and transmissible gastroenteritis virus (12).

Seventeen amplified products were submitted for sequencing. We conducted sequence identity matrix using BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A phylogenetic tree based on nucleotide sequences was obtained using MEGA6 software (<http://www.megasoftware.net>).

The most frequent gross manifestations observed were petechial hemorrhages of the kidney (7 piglets) and ulcerative lesions at the tongue (6 piglets) and coronary bands (4 piglets) (Figure 1, panels A, B). Interstitial pneumonia, the predominant histopathologic alteration, occurred in all the piglets; other frequent lesions were diphtheric glossitis (6 piglets), lymphocytic myocarditis (6 piglets), ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder (Figure 1, panel C) and the ureters (4 piglets), and lymphoplasmacytic encephalitis (3 piglets).

Consistent SVA IHC staining occurred at the transitional epithelium of the renal pelvis and the urinary bladder

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

**Table 1.** Geographic locations and other characteristics of pig farms affected by Senecavirus A, Brazil, 2015

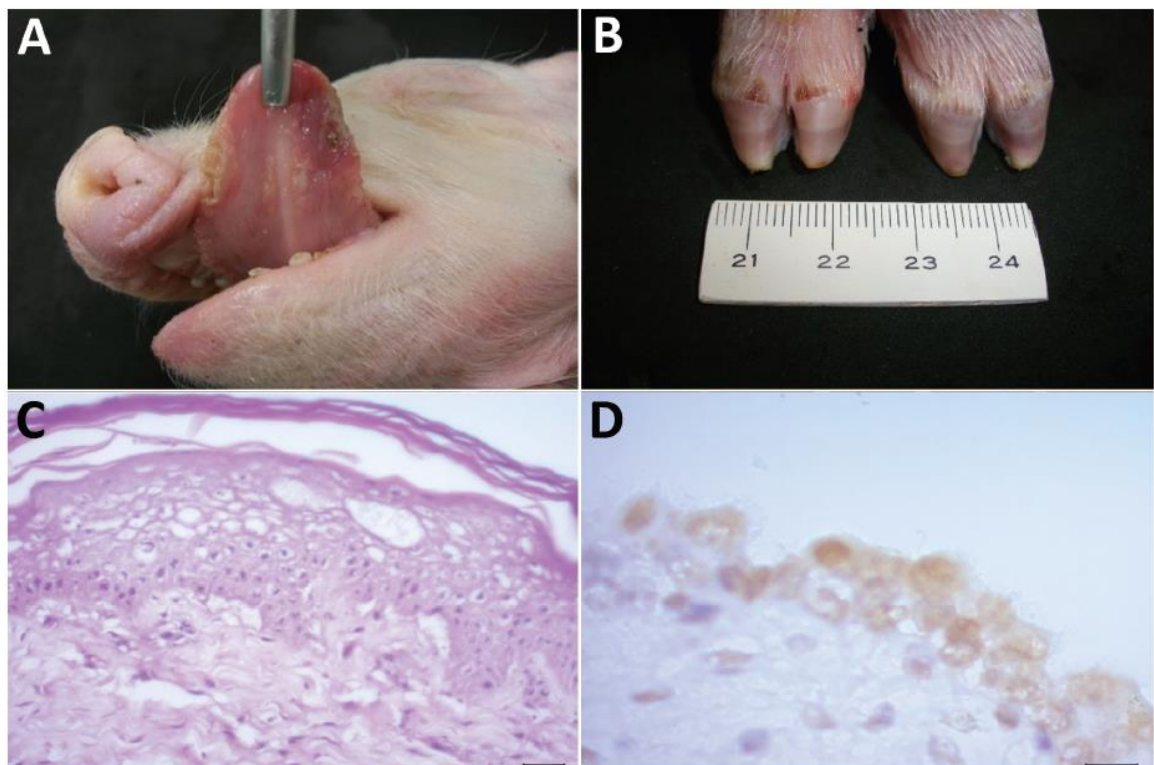
Farm	State/region	Month of collection	Animal no.	Age, d	Principal clinical manifestations
A	Paraná/Southern Brazil	February	1	2	Weakness at birth, sudden death at 1–3 d of age
			2	1	
B	Paraná/Southern Brazil	February	3	2	Weakness at birth, sudden death at 1–3 d of age
			4	1	
C	Mato Grosso do Sul/Midwest Brazil	March	5	3	Cutaneous hyperemia, diarrhea, excessive salivation, lethargy, death
D	Santa Catarina/Southern Brazil	March	6	2	Acute diarrhea and/or wasting, death
E	Santa Catarina/Southern Brazil	July	7	2	Diarrhea, neurologic manifestations, sudden death
			8	2	
			9	4	
			10	5	

(Figure 1, panel D) of 4 piglets; within epithelial cells of the choroid plexus of the cerebrum (8 piglets) and the tongue (5 piglets); and at the ependymal cells of the choroid plexus, vascular endothelium, and the enterocytes of the villi of the small intestine (2 piglets) (Table 2, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/22/7/15-1583-T2.htm>).

The expected SVA RNA fragment was amplified by reverse transcription PCR from 77.8% (63/81) of all organs; all tissues from piglet 4 were positive for SVA and

only 1 tissue sample from 3 piglets (nos. 2, 3, and 10) yielded negative results. Moreover, the nucleic acids of all other viruses investigated during this study were not amplified.

Sequence analysis from the 17 amplicons showed 98.8%–100% nt and aa similarities between each other and other isolates from Brazil available in GenBank (accession nos. KR075677 and KR075678). The SVA isolates we identified had similarities that varied from 87.4% nt (GenBank accession no. EU271760) to 98.5% nt (GenBank



**Figure 1.** Pathologic alterations in piglets infected with Senecavirus A, Brazil, 2015. Gross examination shows multifocal diphtheric glossitis (A) and ulcerations of the coronary band (B). Histopathologic images demonstrate ballooning degeneration of the epithelium of the tongue (C) and positive immunoreactivity of the uroepithelium of the urinary bladder (D) to Senecavirus A. Panel B, scale shown in centimeters; panel C, hematoxylin and eosin stain; scale bar indicates 20  $\mu$ m; panel D, immunoperoxidase; scale bar indicates 10  $\mu$ m.

## DISPATCHES

accession no. KC667560) and 94.4% aa (GenBank accession nos. EU271759 and EU271760) to 99.4% aa (GenBank accession no. KC667560) for isolates identified in North America. Phylogenetic analysis showed that the strains from this study (GenBank accession no. KT445973–KT445977) clustered with other known isolates of SVA and were distant from other picornaviruses associated with vesicular diseases (Figure 2).

### Conclusions

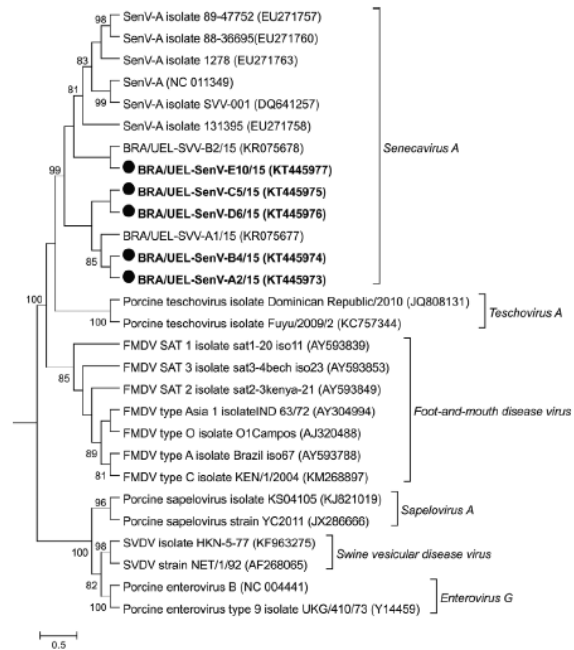
SVA has been associated with PIVD in pigs with vesicular lesions at the snout, coronary band, and hooves (1–3). However, findings from our investigation suggest a new clinical syndrome associated with SVA infection that resulted in disease to multiple tissues and organs of these piglets.

The patterns of the cutaneous lesions identified in this study might be similar to those of other vesicular infections of picornavirus (FMDV and SVDV), in which ballooning degeneration of epithelial cells and the formation of microvesicles are hallmarks (14,15). In addition, FMDV and SVDV affect different organs of susceptible animals—the heart, lungs, lymph nodes, bone marrow, and central nervous system (14,15)—suggesting a wide organ tropism of these viruses.

An interesting feature during this study was the constant immunolabelling of SVA within epithelial cells of the choroid plexus of the brain and the surrounding endothelia of blood vessels in piglets with neurologic disease. On the basis of the IHC results and molecular findings in different tissues of the brain, we theorized that the neurologic manifestations of SVA observed during this investigation might be due to early infection of the choroid plexus through alteration of the integrity of the vascular epithelium and subsequent dissemination to the adjacent neuropil. The IHC detection of SVA within the urinary epithelium of all piglets suggests that urine might be a mode of dissemination and a possible source of contamination within affected pig farms.

Another unusual finding associated with SVA infection during this study was the occurrence of diarrhea in piglets. Molecular screening did not detect any of the common enteric viral pathogens of suckling piglets. However, the IHC and reverse transcription PCR identified SVA in the small intestine of piglets with diarrhea, demonstrating the ability of SVA to replicate within the enteric epithelium.

Our results suggest that SVA is a pantropic virus that produces a multisystemic disease entity in pigs infected at an early age. The constant immunolabelling of the uroepithelium of all piglets with SVA antigens might indicate that in-pen contamination, through urine, should be considered as a possible route for the dissemination of this virus.



**Figure 2.** Phylogenetic relationship of strains of Senecavirus A identified in Brazil during 2015 (black circles) and other sequences available in GenBank derived from species of picornavirus associated with vesicular disease. Maximum-likelihood phylogenetic tree construction used the Kimura 2-parameter model with  $g$  distribution based on the partial viral protein (VP) 3/VP1 region of the Senecavirus A genome. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values determined in 1,000 replication. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

The following Brazilian institutes provided financial support: National Council of Scientific and Technological Development, Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education, Financing of Studies and Projects, and Araucaria Foundation. R.A.L., S.A.H., A.F.A., and A.A.A. received National Council of Scientific and Technological Development fellowships and grants.

Dr. Leme is PhD fellow at Laboratory of Animal Virology and Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Brazil. Her research interests include molecular epidemiology surveillance of emerging and reemerging viruses of swine.

### References

1. Singh K, Corner S, Clark SG, Scherba G, Fredrickson R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J Vet Sci Technol*. 2012;3:1–3.
2. Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can Vet J*. 2008;49:84–5.
3. Leme RA, Zotti E, Alcântara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, et al. Senecavirus A: an emerging vesicular infection

- in Brazilian pig herds. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62:603–11. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12430>
4. Vannucci FA, Linhares DC, Barcellos DE, Lam HC, 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. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62:589–93. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12410>
  5. Yang M, van Bruggen R, Xu W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24:42–50. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638711426323>
  6. World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015 [cited 2015 Mar 27]. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
  7. Donin DG, Leme RA, Alfieri AF, Alberton GC, Alfieri AA. First report of porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV) and enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46:523–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z>
  8. Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J Virol Methods.* 1999;78:191–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00177-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00177-3)
  9. McIntosh KA, Tumber A, Harding JC, Krakowka S, Ellis JA, Hill JE. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet Microbiol.* 2009;133:23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.010>
  10. Médici KC, Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified in polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Swine Health Prod.* 2011;19:146–50.
  11. Molinari BL, Lorenzetti E, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1019–22. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.130776>
  12. Kim SY, Song DS, Park BK. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:516–20. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870101300611>
  13. Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1227–30. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.140296>
  14. Arzt J, Baxt B, Grubman MJ, Jackson T, Juleff N, Rhyan J, et al. The pathogenesis of foot-and-mouth disease II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58:305–26. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01236.x>
  15. Escribano-Romero E, Jiménez-Clavero MA, Ley V. Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. *Anim Health Res Rev.* 2000;1:119–26. <http://dx.doi.org/10.1017/S1466252300000104>

Address for correspondence: Amauri A. Alfieri, Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 10011, 86057-970, Londrina, Parana, Brazil; email: [alfieri@uel.br](mailto:alfieri@uel.br)

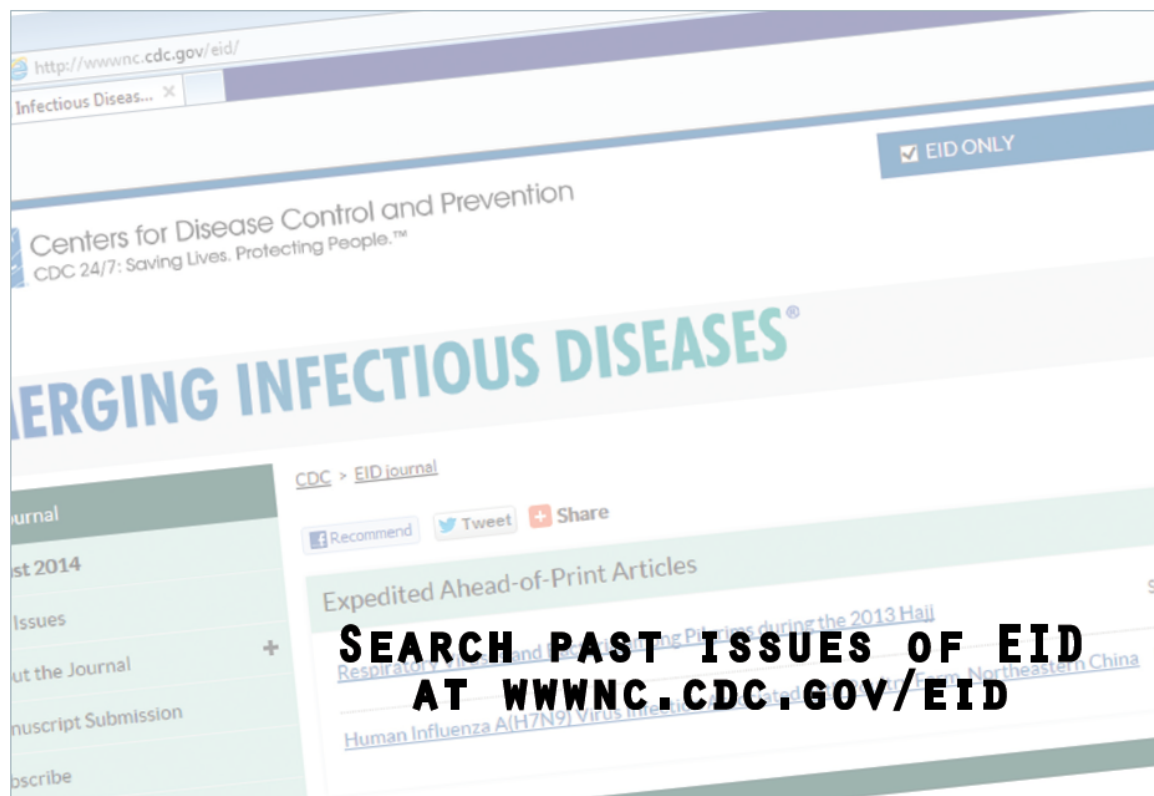


Table 2. Distribution of nucleic acid and antigens of *Senecavirus A* in 1 to 5 day-old piglets \*

Farm	Piglet no.	Identification of <i>Senecavirus A</i>		
		Organs	RT-PCR	IHC
A	1	Tongue	+	+
		Gingiva	+†	+
		Ruptured cutaneous vesicle (thorax)	+	-
		Coronary band ulcerations	+	Not done
		Myocardium	+†	-
		Lung	+	-
		Liver	-	-
		Renal pelvis	+†	+
		Cerebrum	-	+§
		Cerebellum	+	-
	Brainstem	-	-	
	2	Tongue	+	+
		Myocardium	+†,‡	-
		Lung	+	-
		Liver	+	-
		Renal pelvis	+†	+
		Cerebrum	-	+§
		Cerebellum	+	-
Brainstem		+	-	
B	3	Tongue	+	+
		Coronary band ulceration	+	Not done
		Myocardium	+†	-
		Lung	+	-
		Liver	+	-
		Renal pelvis	+†	+
		Brain	-	+
		Cerebellum	+	-
	Brainstem	+	-	
	4	Tongue	+	+
		Gingiva	+†	+
		Myocardium	+†	-
		Lung	+	-
		Liver	+	-
		Renal pelvis	+†,‡	+
		Cerebrum	+	+§
		Cerebellum	+	-
		Brainstem	+†	-
C		5	Myocardium	+
	Lung		+†,‡	-
	Liver		-	-
	Small intestine with fecal content		+	+
D	6	Small intestine with fecal content	+†,‡	+
E	7	Myocardium	-	-
		Lung	-	-
		Spleen	+†	-
		Renal pelvis	-	+
		Urinary bladder	+	+
		Small intestine with fecal content	-	-
		Cerebrum	-	+§
		Cerebellum	-	-
		Brainstem	-	-
		8	Myocardium	+
	Lung		+†	-
	Spleen		+	-
	Renal pelvis		+	+
	Urinary bladder		+	+
	Small intestine with fecal content		-	-
	Cerebrum		+	+§
	Cerebellum		+	-
	Brainstem	-	-	
9	Gingiva	+	+	
	Myocardium	+	-	
	Lung	+	-	
	Spleen	+	-	
	Renal pelvis	+	+	

	Urinary bladder	+†	+
	Small intestine with fecal content	+	-
	Cerebrum	-	+§
	Cerebellum	-	-
	Brainstem	+	-
10	Tongue	+†,‡	+
	Gingiva	+	+
	Myocardium	+	-
	Lung	+	-
	Spleen	+	-
	Renal pelvis	+	+
	Urinary bladder	+	+
	Small intestine with fecal content	+	-
	Cerebrum	+	+§
	Cerebellum	+	-
	Brainstem	-	-

\* RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; IHC, immunohistochemistry

† amplicons submitted for sequence analysis.

‡ amplicons representative of each farm in the phylogenetic tree construction.

§ choroid plexus.

**3.3 PATHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR FINDINGS  
ASSOCIATED WITH SENV-A-INDUCED LESIONS IN NEONATAL PIGLETS  
(<http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.011>)**

---

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



## INFECTIOUS DISEASE

# Pathological, Immunohistochemical and Molecular Findings Associated with Senecavirus A-Induced Lesions in Neonatal Piglets

R. A. Leme<sup>\*</sup>, T. E. S. Oliveira<sup>†</sup>, A. F. Alfieri<sup>\*</sup>, S. A. Headley<sup>†</sup>  
and A. A. Alfieri<sup>\*,‡</sup>

<sup>\*</sup>Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, <sup>†</sup>Laboratory of Animal Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine and <sup>‡</sup>Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

## Summary

This study investigated the cause of the mortality of piglets with cutaneous, enteric and neurological disorders from seven pig farms located in different geographical regions of Brazil. Twelve 1- to 5-day-old piglets were submitted for pathological evaluation. The principal gross findings included faint rib impressions on the pleural surface of the lungs ( $n = 9$ ), diphtheritic glossitis ( $n = 6$ ) and ulcerative lesions at the coronary band ( $n = 5$ ). Histopathology revealed interstitial pneumonia ( $n = 12$ ), myocarditis ( $n = 6$ ), diphtheritic glossitis ( $n = 3$ ), encephalitis ( $n = 3$ ) and atrophy of intestinal villi with vacuolation of the superficial epithelial cells ( $n = 6$ ). Immunohistochemistry with monoclonal antibodies specific for Senecavirus A (SenV-A) demonstrated immunoreactivity of the choroid plexus of the cerebrum, degenerate epithelium of ulcerative lesions of the tongue, the urothelium of the kidney and urinary bladder, and the superficial cells of the intestine. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR), PCR and/or quantitative PCR assays were used to investigate viral agents associated with vesicular and/or enteric diseases. Antigens and RNA of SenV-A were identified in multiple tissues of all piglets; molecular assays for all other viruses evaluated yielded negative results. These findings confirm the participation of SenV-A in the multiple lesions observed in these piglets. Several theories are proposed: SenV-A may be eliminated via the urinary system, neurological disease may occur due to initial invasion of choroid plexus, enteric disease may be related to atrophy and fusion of villi of the small intestine, and vertical transmission could be a form of dissemination.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** pathogenesis; picornavirus infection; porcine idiopathic vesicular disease; Seneca Valley virus

## Introduction

Senecavirus A (SenV-A), formerly referred to as Seneca Valley virus, is the single representative species of the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family. SenV-A is a single-stranded, positive-sense, non-enveloped RNA virus with a genome size of approximately 7.2 kilobases (Hales *et al.*, 2008). This virus was first isolated as a cell culture contaminant in 2002 (Knowles,

2005), with the first complete genome sequence determined in 2005 (Hales *et al.*, 2008).

A vesicular disease of unknown aetiology, named porcine idiopathic vesicular disease (PIVD), was reported from pig herds of different countries, including Australia (Munday and Ryan, 1982), New Zealand (Montgomery *et al.*, 1987), the UK (ProMED-mail, 2007) and Italy (Sensi *et al.*, 2010). PIVD was also reported in pigs from Indiana, USA (Amass *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2012) and Manitoba, Canada (Pasma *et al.*, 2008). Recently, cases of SenV-A associated

Correspondence to: S. A. Headley (e-mail: [selwyn.headley@uel.br](mailto:selwyn.headley@uel.br)).

0021-9975/\$ - see front matter  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.011>

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

disease were described in pigs from distinct geographical regions of Brazil (Leme *et al.*, 2015) and the virus was also identified from the vesicular fluid and sera of sows with PIVD and in piglets from this country (Vannucci *et al.*, 2015; Leme *et al.*, 2016). In addition, the complete genome of SenV-A was obtained from an outbreak of piglet mortality in China (Wu *et al.*, 2016).

Although the genome of SenV-A virus is described by several groups (Hales *et al.*, 2008; Vannucci *et al.*, 2015), the pathological findings associated with this virus are poorly understood. This study describes the pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with spontaneous SenV-A-induced infections in piglets, and supplements the results of a previous investigation (Leme *et al.*, 2016).

### Materials and Methods

#### Clinical Information

The clinical history of the animals and the geographical distribution of the farms affected are given in Table 1. The affected piglets were 1–5 days old.

The piglets originated from four States and three geographical regions of Brazil. Since January 2015, there have been reports of a vesicular disease of unknown aetiology affecting several pig herds from diverse geographical regions of Brazil. By the end of February 2015, two pig herds (A and B) from distinct cities of the State of Paraná, Southern Brazil, reported the birth of weak piglets and the sudden death of piglets at 1–3 days of age.

By March 2015, the death of piglets during the first week of age had been reported from two farms from the states of Mato Grosso do Sul, Midwest Brazil (farm C) and Santa Catarina (SC), Southern Brazil (farm D). Piglets from farm C demonstrated lethargy, excessive salivation, cutaneous hyperaemia and diarrhoea. The piglets from farm D presented with acute diarrhoea and/or wasting, with death occurring soon after.

In July 2015, four piglets (2- to 5-days-old) from a farm (E) located in SC, Southern Brazil, were submitted for necropsy examination. Piglets from this farm demonstrated acute diarrhoea and neurological signs. The clinical signs persisted for approximately 3–7 days and then disappeared in all piglets that

**Table 1**  
Geographical locations of farms affected, biological data and clinical findings of piglets.

Farms affected	Geographical locations (state Brazilian region)	Piglet number	Age (days)	Principal clinical signs
A	Paraná/Southern Brazil	1	2	Birth of weak piglets Sudden death of animals between 1 and 3 days of age
		2	1	
B	Paraná/Southern Brazil	3	2	Birth of weak piglets Sudden death of animals between 1 and 3 days of age
		4	1	
C	Mato Grosso do Sul/ Midwest Brazil	5*	3	Cutaneous hyperaemia Death Diarrhoea Excessive salivation Lethargy
D	Santa Catarina/ Southern Brazil	6*	2	Acute diarrhoea and/or wasting Death
E	Santa Catarina/ Southern Brazil	7	2	Diarrhoea Neurological signs Sudden death
		8	2	
		9	4	
		10	5	
F	São Paulo/Southeastern Brazil	11	3	Death Diarrhoea Neurological signs
G	Santa Catarina/ Southern Brazil	12	2	Death Diarrhoea Wasting

\*Tissues of pigs received for histopathological evaluation.

recovered from this disease. In all of these farms, the total pig populations ranged from 10,000 to 23,000 animals, with mortality rates of piglets during the first week of age varying from 20% to 30%.

The consulting veterinarian at farm F (São Paulo, SP; Southeastern Brazil) indicated that diarrhoea affecting piglets began in late August 2015. At that time, there were 2,500 piglets with morbidity estimated at 60% and 15% mortality. In late September 2015, SenV-A was identified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay of vesicular fluid and cutaneous lesions from gestating sows on farm G, Santa Catarina, Southern Brazil; there were 940 gestating sows with morbidity estimated at 30%, but no reported cases of mortality. This herd contained 150 piglets with diarrhoea, with 15% of the affected animals dying during the first week of age.

In addition, all farms, except farm C, reported that gestating and/or farrowing sows demonstrated fluid-filled and/or ruptured vesicles at the coronary band, hooves and/or snout; reproductive disorders were not observed. SenV-A RNA was identified in samples from the ruptured vesicles and ulcerative lesions of sows on farms A and B (Leme *et al.*, 2015).

#### Gross Pathology

Routine necropsy examination of 10 piglets was performed soon after death; tissue fragments were received from piglet number 5 (farm C) and piglet number 6 (farm D). Selected tissues from all animals subjected to necropsy examination, as well as the tissue fragments from the two piglets, were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed routinely. Duplicate sections of the organs mentioned above, as well as swabs from oral vesicles and cutaneous lesion scrapings, were collected freshly during necropsy examination and maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed for molecular diagnostics.

In order to avoid cross contamination, equipment used during necropsy examination and sample collection was cleaned and immersed in a mixture of antiseptic and disinfectant solution between each collected sample. Faecal samples from piglets with diarrhoea from farms C, D, E, F and G were collected to investigate the possible participation of enteric viruses associated with diarrhoea.

#### Immunohistochemistry

Selected tissue fragments from each piglet, as well as the tissues from the piglets on farms C and D, were studied by immunohistochemistry (IHC) using monoclonal antibodies to detect SenV-A (Yang

*et al.*, 2012). These reagents were kindly provided by Dr. M. Yang, National Centre for Foreign Animal Disease, Manitoba, Canada. The IHC protocol (Headley *et al.*, 2001) involved incubation with monoclonal antibody F60SVV-76 (1 in 50 dilution) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The secondary detection system was SuperPicture™ Polymer Detection kit (Invitrogen, Camarillo, California, USA).

#### Molecular Characterization of Senecavirus A

Tissue samples were disrupted with a MagNa Lyser™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), homogenized in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and clarified by centrifugation at 3,000 g for 10 min. Faecal suspensions were prepared at 10–20% (w/v) in 0.01 M PBS and centrifuged at 5,000 g for 3 min.

The supernatants were used for nucleic acid extraction. This was performed by using 400  $\mu\text{l}$  of faecal homogenate (10–20% w/v) and proteinase K pretreated aliquots of tissue suspensions in a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate extraction methods (Boom *et al.*, 1990; Alfieri *et al.*, 2006). The extracted nucleic acid was eluted in 50  $\mu\text{l}$  of ultrapure RNase-free di-ethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water (Invitrogen). Positive controls consisted of viral RNA from a previous study (Leme *et al.*, 2015); sterile ultrapure water (Invitrogen) was used as a negative control during all nucleic acid extractions and amplification procedures.

The possible participation of SenV-A RNA in these lesions was investigated by using a RT-PCR assay designed to target a 542 base pair sequence of the partial VP3/VP1 regions of the virus genome (Leme *et al.*, 2015).

#### Differential Molecular Diagnosis

Molecular assays were performed to identify the nucleic acids of viruses that might be associated with cutaneous and/or vesicular lesions, wasting, neurological or systemic disorders of pigs. These included SenV-A, foot-and-mouth disease virus (FMDV), vesicular stomatitis virus (VSV), swine vesicular disease virus (SVDV), *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, and *Enterovirus G*, porcine parvovirus (PPV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). The participation of FMDV, VSV and SVDV were investigated as recommended by the OIE Terrestrial Manual (Hofner *et al.*, 1994; Núñez *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2000; OIE, 2015). The identification of teschovirus A, sapelovirus A and enterovirus G was investigated by targeting the partial 5' non-translated region of the genome these

**Table 2**  
**Distribution of Senecavirus A antigen and nucleic acid in piglets.**

Piglet number	Selected tissues/diagnostic techniques (IHC and RT-PCR)																						
	Tongue		Gingiva		Myocardium		Lung		Renal pelvis		Liver		Urinary bladder		Cerebrum		Cerebellum		Brainstem		Small intestine		
	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	IHC	RT-PCR	
1*	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	NC	NC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	NC	NC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5†	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6†	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	NC	NC	NC	NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	NC	NC	NC	NC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	NC	NC	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	NC	NC	NC	NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	NC	NC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*Piglet with coronary band lesion RT-PCR positive.  
 †Tissues from piglets submitted for diagnostic evaluation, NC, not collected.  
 ‡Sequenced sample.  
 §Isolate used in the phylogenetic analysis.  
 ¶Choroid plexus.

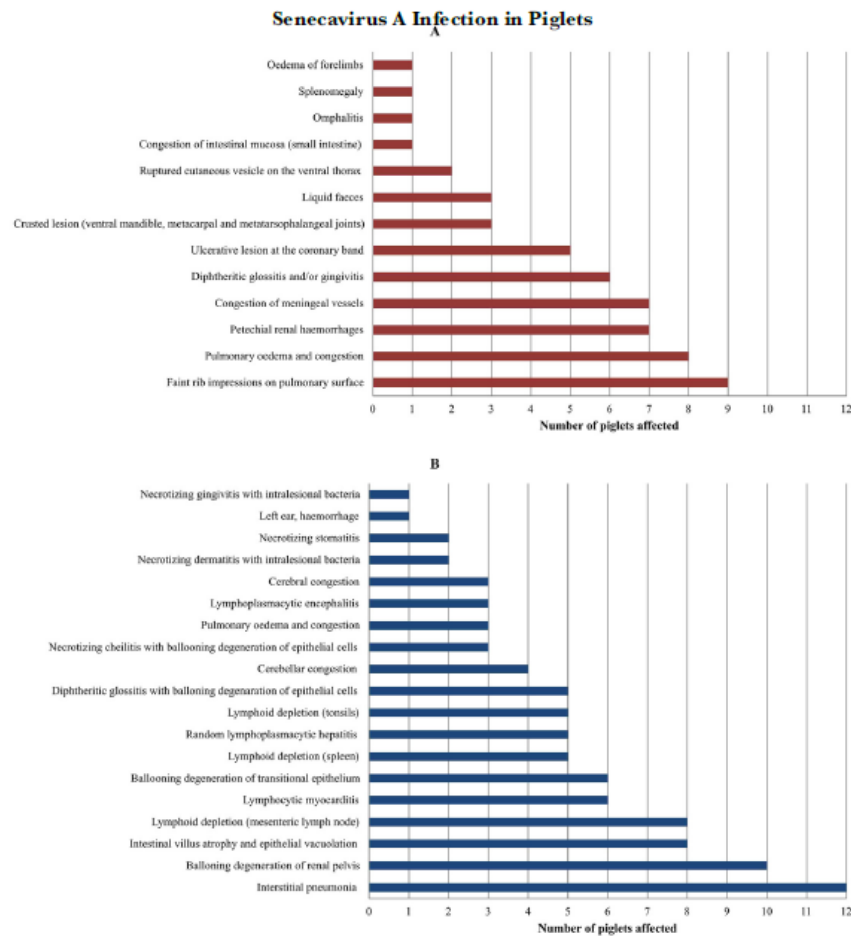


Fig. 1. Graphical demonstration of the distribution of the principal gross (A) and histopathological (B) findings in piglets infected with Senecavirus A.

viruses (Krumbholz *et al.*, 2003; Donin *et al.*, 2014). PCR and qPCR assays for PPV and PCV2, respectively, targeted the partial PPV NS1 (Soares *et al.*, 1999) and PCV2 ORF2 (McIntosh *et al.*, 2009) genomic regions.

All organs collected from each piglet were evaluated for all the viruses described above, except for PPV and PCV2, which were only tested for in samples of the heart and lungs. Additionally, faeces and fragments of the small intestine from piglets of farms C, D, E, F and G with clinical manifestations of diarrhoea were evaluated for porcine rotavirus species A (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992), B (Marthaler *et al.*, 2012), C (Alfieri *et al.*, 1999) and H (Molinari *et al.*, 2014); porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV), partial genes S and M (Kweon *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001); swine deltacoronavirus (SDCoV), partial genes M and N (Wang *et al.*, 2014); and trans-

missible gastroenteritis virus (TGEV), partial gene S (Kim *et al.*, 2001). Positive controls consisted of nucleic acids of viral agents from a previous study (Leme *et al.*, 2016). Sterile water was used as negative control (Invitrogen). These controls were included in all PCR and RT-PCR assays.

#### Sequence Analysis

Seventeen amplified products from the SenV-A RT-PCR assay were submitted for sequencing. Table 2 presents the amplified products submitted for sequence analysis according to the tissue samples of each piglet. Amplicons were purified by the PureLink<sup>®</sup> Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) and quantified with a Qubit<sup>®</sup> fluorometer (Invitrogen). These were then sequenced in both directions with the forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyzer with the BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1

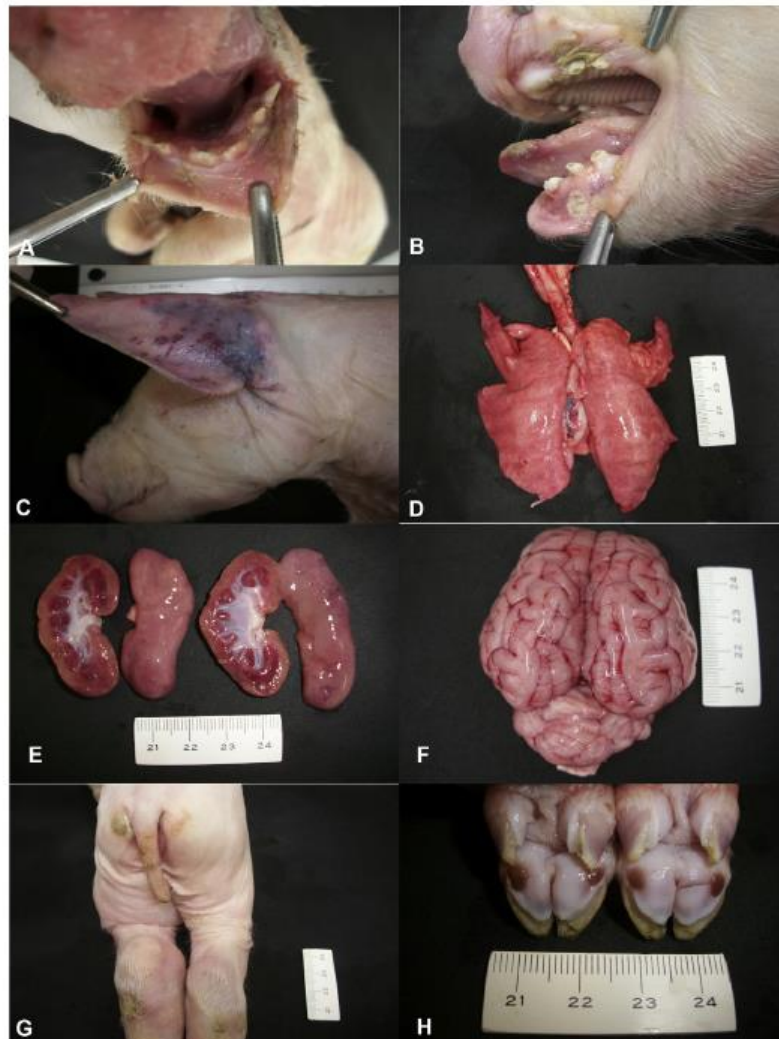


Fig. 2. Pathological changes in piglets infected with Senecavirus A. There is multifocal diphtheritic gingivitis (A) and glossitis (B), and petechial haemorrhages of the ear (C). Observe the faint rib impressions on the pulmonary surface (D), haemorrhagic nephritis (E), marked congestion of meningeal vessels of the brain (F), crusting cutaneous lesions at several anatomical locations (G) and ulceration of the plantar foot pad (H). Scale in cm.

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA).

The obtained sequences were examined for quality analysis of chromatogram readings by using the PHRED software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>); sequences were only accepted if base quality was equal to or greater than 20. Consensus sequences were then generated by the CAP3 program (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>), after which the partial nucleotide sequences were initially compared by the Basic Local Alignment

Search Tool (BLAST) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) with similar sequences deposited in GenBank. Sequence identity matrix was performed using the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

## Results

### *Pathological and Immunohistochemical Findings*

The pathological and immunohistochemical findings are summarized in Fig. 1 and Table 2. The most

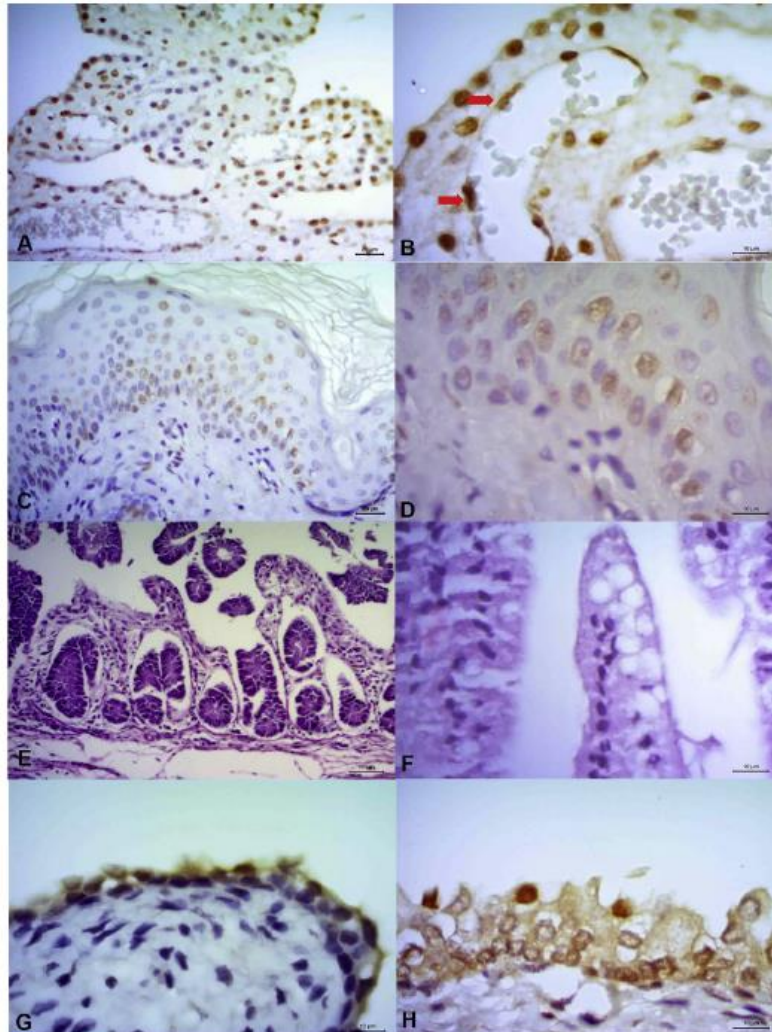


Fig. 3. Histopathological and immunohistochemical findings in piglets infected with Senecavirus A (SenV-A). (A) Cerebrum showing immunolabelling of epithelial cells of the choroid plexus. (B) The endothelial cells (arrows) of the capillaries are also immunoreactive to SenV-A. (C–D) Labelling of epithelial cells of the tongue for SenV-A antigen. (E) There is fusion of intestinal villi and (F) vacuolation of the superficial epithelial cells of the small intestine. (G) Labelling of the uroepithelium of the urinary bladder (G) and (H) the renal pelvis of the kidney for SenV-A antigen. IHC, A–D, G and H. HE, E and F.

frequent gross changes observed during necropsy examination of the 10 piglets were faint rib impressions on the pleural surface of the lungs ( $n = 9$ ), pulmonary oedema ( $n = 8$ ), congestion of meningeal vessels ( $n = 8$ ), petechial haemorrhages of the kidney ( $n = 7$ ), diphtheritic glossitis ( $n = 6$ ) and ulcerative lesions at the coronary band ( $n = 5$ ). Three piglets (numbers 1, 4 and 10) with multifocal cutaneous crusts at different anatomical locations (including the ventral region of the mandible, metacarpus, vulva

and the metatarsophalangeal joint) also had diphtheritic glossitis. Liquid faeces, indicative of diarrhoea, were observed in the small intestine of piglets 8, 11 and 12, and were also reportedly seen in piglets 5 and 6. The gross lesions observed during this study are shown in Fig. 2. The stomachs of all piglets were filled with milk.

Interstitial pneumonia was the predominant histopathological alteration and occurred in all piglets examined by necropsy examination, as well as in the

pulmonary fragments of the other two piglets. Other frequent histopathological alterations included lymphoid depletion of the spleen, tonsils and/or lymph nodes ( $n = 8$ ), lymphocytic myocarditis ( $n = 6$ ), ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder and the ureters ( $n = 6$ ) and lymphoplasmacytic encephalitis ( $n = 3$ ). There was vacuolation of the superficial epithelial cells of the intestinal mucosa in six piglets (numbers 5, 6, 7, 8, 11 and 12) with clinical histories of diarrhoea, with atrophy of intestinal villi occurring in six piglets (numbers 5, 6, 9, 10, 11 and 12).

The distribution of SenV-A antigens in tissues from the piglets is given in Table 2. SenV-A antigens were identified in multiple tissues from all piglets. Consistent SenV-A immunohistochemical labelling occurred in the transitional epithelium of the renal pelvis and/or ureters ( $n = 6$ ) of all piglets subjected to necropsy examination and in the urinary bladder (Fig. 3) collected from six piglets with ballooning degeneration of the epithelium. Consequently, there was concomitant positive immunolabelling of the epithelium of the urinary bladder and the renal pelvis in six piglets (numbers 7, 8, 9, 10, 11 and 12). Frequent labelling also occurred of the epithelial cells of the choroid plexus of the cerebrum ( $n = 8$ ) and the affected tongue of most piglets ( $n = 5$ ) with pathological alterations. In addition, labelling was observed in the vascular endothelium within the choroid plexus, and in the vacuolated superficial enterocytes of the small intestine of five piglets. Diarrhoea was observed in three of these animals (numbers 8, 11 and 12).

#### *Molecular Characterization of Senecavirus A*

SenV-A RNA of expected size was amplified successfully from the RT-PCR assays of most of the organs collected from the 12 piglets. The distribution of viral RNA in tissues/organs from each piglet is given in Table 2. SenV-A RNA was most frequently amplified from the lungs ( $n = 10$ ), renal pelvis ( $n = 9$ ), myocardium ( $n = 9$ ), small intestine ( $n = 8$ ) and cerebellum ( $n = 7$ ). Viral RNA was amplified from the kidneys of most piglets ( $n = 7$ ) that demonstrated antigens of SenV-A by IHC. This correlation also occurred for the urinary bladder of the six piglets that had viral antigens demonstrated by IHC. In addition, viral RNA was amplified from the intestine of most of the piglets with diarrhoea.

The RNA of teschovirus A, sapelovirus A and enterovirus G, that might be associated with cutaneous lesions and has been previously reported in pig herds from Brazil (Donin *et al.*, 2014, 2015), was not detected in any of the tissues from the piglets. Similarly, the targeted nucleic acid regions of

viruses associated with vesicular disease, myocarditis and/or encephalomyelitis were not identified during this investigation. DNA of PPV and PCV2, viral agents related to early death of piglets, wasting, dermatitis syndrome, vesicular disease and/or systemic clinical signs, was not detected in the tissue samples evaluated. In addition, the RT-PCR assays for porcine RVA, RVB, RVC, RVH, PEDV, SDCoV and TGEV did not detect the genomes of these viruses in the faecal samples from piglets of farms C, D, E, F and G.

#### *Phylogenetic Analysis*

The SenV-A sequences derived from these piglets have been deposited in GenBank (Accession numbers KT445973, KT445974, KT445975, KT445976 and KT445977), and represent samples from most pig farms. Sequence analysis of the 17 amplicons from this study revealed 98.8%–100% nucleotide similarities between each other and with other isolates recently described in Brazil (KR075677 and KR075678). At the amino acid level, the isolates in this study were 100% identical with each other and with the two previously mentioned strains from Brazil, except for the amino acid sequences from piglets 5 and 10, which were 98.8% similar to each other and 99.4% similar to the other sequences in this study. Relative to the other SenV-A sequences available in GenBank (i.e. DQ641257, EU271757, EU271758, EU271759, EU271760, EU271761, EU271762, EU271763, KC667560 and NC\_011349), the strains described here had homology ranging from 87.4% (EU271760) to 98.5% (KC667560) for nucleotide sequence and 94.4% (EU271759 and EU271760) to 99.4% (KC667560) for amino acid sequence. The diagrammatic representation of the phylogenetic relationship between the isolates from this study and similar strains of picornavirus associated with vesicular disease, deposited in GenBank, has been published elsewhere (Leme *et al.*, 2016).

#### **Discussion**

The results of these pathological and molecular investigations have demonstrated the participation of SenV-A in the multiple lesions observed in the 10 piglets subjected to necropsy examination and in the tissues of two piglets received for diagnosis from the Southern, Southeastern and Midwest regions of Brazil. Consequently, these findings extend the geographical distribution of SenV-A in swine to include Brazil, and correlate with other investigations from this country (Vannucci *et al.*, 2015; Leme *et al.*,

2015, 2016). The results suggest an early manifestation of SenV-A-induced infection in all piglets and demonstrate the susceptibility of young pigs to this virus, with resulting multisystemic disease (Leme *et al.*, 2016).

Currently, the known vesicular disease-associated picornaviruses might be considered as models to understand the forms of transmission, pathogenesis and infection associated with SenV-A, since these viruses have similar molecular features, are within the same family and produce indistinguishable clinical signs in pigs, suggesting similar viral biological properties in this host species. The ballooning degeneration observed in the cutaneous lesions induced by SenV-A during this study may have a similar pattern to that observed in the established diseases induced by FMDV and SVDV, in which ballooning degeneration of epithelial cells and the formation of microvesicles are the hallmarks of infection (Escribano-Romero *et al.*, 2000; Arzt *et al.*, 2011). Erosive lesions were also observed at the coronary bands of several piglets and in a study by another group (Vannucci *et al.*, 2015). These lesions are similar to those seen in cases associated with FMDV. Additionally, FMDV and SVDV affect different organs (e.g. myocardium, lungs, lymph nodes, bone marrow and central nervous system) of susceptible animals (Escribano-Romero *et al.*, 2000; Arzt *et al.*, 2011), suggesting a tropism of these viruses for different cells. Similar results were observed during this investigation, where multiple systems (i.e. nervous, respiratory, urinary, cutaneous and digestive) contained SenV-A antigens and/or nucleic acid as observed by IHC and RT-PCR, suggesting systemic dissemination of the virus in all piglets.

The atrophy and fusion of the villi of the small intestine with the vacuolation of superficial epithelial cells observed by histopathology in four piglets (numbers 5, 6, 11 and 12), associated with the positive immunolabelling of SenV-A antigens within these lesions, suggests that this infectious agent was associated with the clinical enteric manifestations that occurred on several farms. In addition, viral RNA was amplified from the intestinal content from three of these piglets. Although similar histopathological findings were described in suckling pigs infected experimentally with PEDV (Jung *et al.*, 2014), this virus was not amplified from any intestinal fragment and/or faeces from these piglets. The vacuolation of superficial epithelial cells observed in this and a previous study (Jung *et al.*, 2014) was considered to be ballooning degeneration, an early indication of virus-induced injury. The failure of molecular assays to identify other agents frequently associated with gastrointestinal disease in pigs supports the likely participation

of SenV-A in the development of these enteric clinical manifestations and pathological findings.

Due to the consistent immunolabelling and amplification of SenV-A within epithelial cells of the choroid plexus, the urinary bladder and the renal pelvis, and the small intestine of several piglets, we propose three hypotheses. The first is that the neurological manifestations of this disease might be related to early infection of the choroid plexus via alteration of the integrity of the vascular epithelium and subsequent dissemination to the adjacent neuropil. The second suggests that urine from infected piglets may be a means by which the virus is disseminated and provides a possible source of contamination on affected pig farms (Leme *et al.*, 2016). Thirdly, the pathological, immunohistochemical and molecular results suggest that SenV-A can induce gastrointestinal disease in neonatal piglets. Experimental models are being designed to investigate these hypotheses.

During this study, and based on ongoing routine investigations (unpublished data) of the distribution of viral RNA and tissue antigens of SenV-A, we have observed that positive results for RT-PCR and IHC are more frequently and constantly obtained in specific tissues. RT-PCR for the detection of SenV-A RNA is more likely to be positive using pulmonary and myocardial tissues, and possibly also brainstem; while the tissues of choice for IHC are the renal pelvis and the urinary bladder. Consequently, we recommend these tissues for the individual detection (either by RT-PCR or IHC) of SenV-A; while the renal pelvis and urinary bladder is the tissue of choice for the combined molecular and immunohistochemical diagnosis of SenV-A infection.

FMDV crosses the placental barrier, particularly during the early stages of gestation (Ryan *et al.*, 2007). However, this study was done in sheep and it is not clear if FMDV or SVDV are able to cross the placental barrier resulting in intra-uterine infections in pigs. The detection of SenV-A by RT-PCR in 1- to 2-day-old piglets with pathological lesions and disseminated immunolabelling of viral antigens, suggests that the virus might have been vertically transmitted. We have previously identified SenV-A in multiple fluid-filled and/or ruptured vesicles and ulcerative lesions of the coronary band, hooves and/or snout from gestating sows of farms A and B (Leme *et al.*, 2015); however, it remains to be demonstrated experimentally that SenV-A can cross the placental barrier and infect the fetus.

In conclusion, the results from this investigation suggest that neonatal piglets are susceptible to infection by SenV-A, resulting in a multisystemic disease due to viral tropism for several tissues. The concomitant identification of SenV-A virus in sows and piglets

from three farms may suggest that vertical transmission is possible, while the consistent immunolabelling of the urothelium of all piglets for antigens of SenV-A might suggest that in-pen contamination, via urine, should be considered as a possible route for the dissemination of this virus. Furthermore, SenV-A appears to produce enteric manifestations and disease in neonatal piglets.

### Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian institutes for financial support: the National Council 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 Araucária Foundation (FAP/PR). RA Leme, TES Oliveira, AF Alfieri, SA Headley and AA Alfieri are recipients of CNPq fellowships. The authors thank Dr. M Yang, National Centre for Foreign Animal Disease, Winnipeg, Manitoba, Canada for providing monoclonal antibody used during this investigation. We appreciate the assistance during the initial virological investigations provided by Dr. BK Alcântara. The first two authors contributed equally towards this study.

### References

- Alfieri AA, Alfieri AF, Beuttemüller EA (1999) Porcine rotaviruses: etiology, infection and control topics. *Seminã Ciências Agrárias*, **20**, 90–97.
- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Tropical Animal Health and Production*, **38**, 521–526.
- Amass SF, Schneider JL, Miller CA, Shawky SA, Stevenson GW *et al.* (2004) Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. *Journal of Swine Health and Production*, **12**, 192–196.
- Arzt J, Baxt B, Grubman MJ, Jackson T, Juleff N *et al.* (2011) The pathogenesis of foot-and-mouth disease. II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**, 305–326.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM *et al.* (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 495–503.
- Domin DG, Leme RA, Alfieri AF, Alberton GC, Alfieri AA (2014) First report of porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV) and enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, **46**, 523–528.
- Domin DG, Leme RA, Alfieri AF, Alberton GC, Alfieri AA (2015) Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil. *Brazilian Journal Veterinary Research*, **35**, 403–408.
- Escribano-Romero E, Jimenez-Clavero MA, Ley V (2008) Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. *Animal Health Research Reviews*, **1**, 119–126.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia *et al.* (1992) Identification of group A rotavirus genotypes by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 1365–1373.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi Clark HF *et al.* (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 276–282.
- Hales LM, Knowles NJ, Reddy PS, Xu L, Hay C *et al.* (2008) Complete genome sequence analysis of Sen Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *Journal of General Virology*, **89**, 1265–1275.
- Headley SA, Soares IC, Graca DL (2001) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. *Journal of Comparative Pathology*, **125**, 90–97.
- Hofner MC, Carpenter WC, Ferris NP, Kitching RP, Ar Botero F (1994) A heminested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. *Journal of Virological Methods*, **50**, 11–20.
- Jung K, Wang Q, Scheuer KA, Lu Z, Zhang Y *et al.* (2008) Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 668.
- Kim SY, Song DS, Park BK (2001) Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13**, 516–520.
- Knowles NJ (2005) A pan-RT picornavirus RT-PCR identification of novel picornavirus species. *EUROI 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses*, Lunteren, The Netherlands, 23–29th May, p. A06.
- Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld Egerer R *et al.* (2003) Detection of porcine teschovirus and enteroviruses by lightcycler real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, **113**, 51–63.
- Kweon C-H, Lee J-G, Han M-G, Kang Y-B (1997) Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, **59**, 231–232.
- Leme RA, Oliveira TES, Alcântara BK, Headley SA, Alfieri AF *et al.* (2016) Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal piglets. *Emerging Infectious Diseases*, **27**, 1238–1241.
- Leme RA, Zotti E, Alcântara BK, Oliveira MV, Freitas *et al.* (2015) Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 603–611.
- Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goya *et al.* (2012) Detection of substantial porcine group

## Author's Personal Copy

## Senecavirus A Infection in Piglets

155

- rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology*, **433**, 85–96.
- McIntosh KA, Tumber A, Harding JC, Krakowka S, Ellis JA *et al.* (2009) Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Veterinary Microbiology*, **133**, 23–33.
- Molinari BLD, Lorenzetti E, Otonel RAA, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 1019–1022.
- Montgomery JF, Oliver RE, Poole WSH (1987) A vesiculobullous disease in pigs resembling foot and mouth disease. I. Field cases. *New Zealand Veterinary Journal*, **35**, 21–26.
- Munday BL, Ryan FB (1982) Vesicular lesions in swine – possible association with the feeding of marine products. *Australian Veterinary Journal*, **59**, 193.
- Núñez JI, Blanco E, Hernandez T, Gomez-Tejedor C, Martin MJ *et al.* (1998) A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *Journal of Virological Methods*, **72**, 227–235.
- OIE (2015) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015*. World Organisation for Animal Health, Paris.
- Pasma T, Davidson S, Shaw SL (2008) Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal*, **49**, 84–85.
- ProMED-mail (2007) *Archive Number: 20070110.0099. Vesicular Disease, Porcine UK (N. Ireland): NOT FMD, SVD*. International Society for Infectious Diseases.
- Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Samuel AR, Knowles NJ (2000) Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, **89**, 167–176.
- Ryan E, Zhang Z, Brooks HW, Horsington J, Brownlie J (2007) Foot-and-mouth disease virus crosses the placenta and causes death in fetal lambs. *Journal of Comparative Pathology*, **136**, 256–265.
- Sensi M, Catalano A, Tinaro M, Mariotti C, Panziera C *et al.* (2010) *Idiopathic Vesicular Disease (IVD): A Case Report in the Centre of Italy*. 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, July 18th–21st, p. 46.
- Singh K, Corner S, Clark SG, Scherba G, Fredrickson R (2012) Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *Journal of Veterinary Science and Technology*, **3**, 1–3.
- Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ (1999) Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of Virological Methods*, **78**, 191–198.
- Vannucci FA, Linhares DCL, Barcellos DESN, Lam HC, Collins J *et al.* (2015) 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*, **62**, 589–593.
- Wang L, Byrum B, Zhang Y (2014) Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 1227–1230.
- Wu Q, Zhao X, Chen Y, He X, Zhang G *et al.* (2016) Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China. *Genome Announcements*, **4**, e01509–01515.
- Yang M, van Bruggen R, Xu W (2012) Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**, 42–50.

[ Received, May 17th, 2016 ]  
 [ Accepted, June 22nd, 2016 ]

**4 CONCLUSÕES**

**CONCLUSÕES**

- O conjunto de *primers* desenhado neste estudo e padronizado para uso na técnica RT-PCR foi apropriado para a detecção molecular do *Senecavirus A*, representando uma nova técnica para estudos com base na epidemiologia molecular da infecção e evolução do vírus.
- A técnica de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais para a detecção de antígenos de *Senecavirus A* em diferentes amostras de órgãos/tecidos de suínos foi padronizada com sucesso, representando uma técnica adicional de diagnóstico da infecção pelo vírus.
- A detecção molecular e o isolamento de *Senecavirus A* em cultivo celular a partir de líquido de vesícula demonstram que este vírus é o agente causal dos surtos de doença vesicular relatados em suínos de diferentes categorias de produção.
- A detecção molecular do RNA do *Senecavirus A*, a imunoreatividade positiva na técnica de imunohistoquímica e as lesões macro e microscópicas observadas em diferentes órgãos/tecidos de leitões neonatos com sinais clínicos de doença demonstram uma nova síndrome clínica associada à infecção pelo *Senecavirus A*, resultando em doença de múltiplos órgãos/tecidos dos leitões acometidos, incluindo diarreia.
- A detecção concomitante do *Senecavirus A* em matrizes e em leitões de 1-2 dias de idade das mesmas granjas sugere a possibilidade de transmissão vertical do vírus.
- As sequências parciais de nt/aa da região VP1 do *Senecavirus A* obtidas neste estudo foram muito semelhantes entre si, mesmo sendo amplificadas a partir de diferentes amostras biológicas, de animais de diferentes faixas etárias, provenientes de várias granjas localizadas em distintos estados brasileiros, sugerindo que as cepas de *Senecavirus A* atualmente circulando no rebanho suíno brasileiro sejam homólogas.



**PERSPECTIVAS**

Os casos de doença vesicular suína relatados nos EUA (CANNING et al., 2016; GIMENEZ-LIROLA et al., 2016), Brasil (LEME et al., 2015, 2016a, 2016b; VANNUCCI et al., 2015) e China (WU et al., 2016) alertam para o potencial patogênico do *Senecavirus A*, que pode levar a perdas produtivas e econômicas. Adicionalmente, o fato da infecção por esse vírus ser clinicamente indistinguível das infecções por agentes virais classicamente associados a doenças vesiculares, como a febre aftosa, a estomatite vesicular, o exantema vesicular suíno e a doença vesicular suína ressalta a importância do diagnóstico da infecção. Destaca-se a posição que o Brasil ocupa no ranking mundial de produção de suínos, sendo o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína (ABPA, 2016). A suspeita de doenças de notificação obrigatória pode levar a embargos ao comércio internacional de animais e de produtos de origem animal brasileiros, podendo gerar impactos negativos significativos para a economia do país. Portanto, o *Senecavirus A* deve ser incluído na lista de diagnósticos diferenciais de doenças vesiculares clássicas de suínos.

Por ser um vírus RNA fita simples há maior probabilidade de mutações no genoma do *Senecavirus A*, que podem ser expressas por alterações em proteínas importantes tanto na imunogenicidade quanto na virulência do vírus. Com isso, é importante o constante monitoramento das características moleculares e, principalmente, antigênicas das cepas virais circulantes em regiões geográficas distintas.

O estabelecimento de sequências do genoma completo de cepas de *Senecavirus A* detectadas no Brasil é fundamental para a caracterização das cepas virais circulantes nos rebanhos suínos brasileiros, bem como para a realização de análises comparativas com cepas contemporâneas identificadas em outros países como EUA, Canadá e China.



## 6.1 Capítulo de livro

LEME, R. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. *Senecavirus A*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3ª edição. Santa Maria: Editora UFSM, 2017. Cap. 36, p. 1073-1084.



Raquel Arruda Leme, Alice Fernandes Alfieri, Amauri Alcindo Alfieri<sup>1</sup>

Maureen Hoch Vieira Fernandes, Diego Gustavo Diel<sup>2</sup>

Marcos Bryan Heinemann, Adriana Cortez<sup>3</sup>

José Valter Joaquim Silva Júnior, Daisy Elaine Andrade da Silva, Laura Helena V.G. Gil<sup>4</sup>

Fernando Viçosa Bauermann<sup>5</sup>

Fernando Rosado Spilki<sup>6</sup>

1	Introdução .....	1073
2	Senecavírus A.....	1073
2.1	Características do <i>Senecavirus A</i> .....	1073
2.2	Histórico.....	1074
2.3	Epidemiologia .....	1077
2.4	Vias de eliminação e transmissão do <i>Senecavirus A</i> .....	1077
2.5	Morbidade e mortalidade nas diferentes categorias de produção de suínos .....	1078
2.6	Epidemiologia molecular .....	1078
2.7	Sinais clínicos e lesões.....	1080
2.8	Imunidade.....	1081
2.9	Diagnóstico .....	1082
2.10	Controle e profilaxia .....	1083
2.11	Considerações finais .....	1084
3	Vírus da Diarreia Epidêmica Suína .....	1085
3.1	Características do vírus .....	1085
3.2	Epidemiologia .....	1086
3.3	Epidemiologia molecular .....	1086
3.4	Patogenia e sinais clínicos .....	1087
3.5	Resposta imune do hospedeiro .....	1087
3.6	Diagnóstico .....	1088
3.7	Profilaxia e controle.....	1090
3.8	Conclusão .....	1091

1 Responsáveis pela seção Senecavírus A

2 Responsáveis pela seção Vírus da Diarreia Epidêmica Suína

3 Responsáveis pela seção Vírus de Schmaleberg

4 Responsáveis pela seção Vírus da Zika e Vírus Chikungunya

5 Responsável pela seção Pestivírus HoBi-like e pestivírus atípico suíno

6 Responsável pela seção Vírus da Hepatite E

## 1 Introdução

As últimas décadas têm testemunhado o surgimento e ressurgimento de várias enfermidades víricas em populações humanas e animais. As causas da emergência de algumas dessas enfermidades já foram parcialmente esclarecidas e parecem envolver diversos fatores que atuam individualmente ou em conjunto. Alguns exemplos de enfermidades emergentes e re-emergentes e os fatores supostamente envolvidos são descritos no Capítulo 9 – Epidemiologia das Infecções Víricas. Muitas delas estão descritas brevemente nos capítulos relativos às suas famílias. A seguir serão descritos com mais detalhes alguns vírus – e as doenças a eles associadas – que assumiram grande importância nos últimos anos, seja pelo impacto em saúde pública ou pela repercussão econômica na produção pecuária. Alguns deles são reconhecidamente zoonóticos, outros aparentemente infectam apenas animais. Como emergiram recentemente, somente o tempo será capaz de mensurar o seu real impacto nas populações hospedeiras.

## 2 Senecavírus A

O *Seneca Valley virus* (SVV), como foi inicialmente denominado, foi isolado pela primeira vez em Gaithersburg, cidade localizada no estado de Maryland, nos Estados Unidos da América (EUA), em 2002, a partir de cultura de células. Presume-se que o vírus tenha sido introduzido no cultivo celular pelo uso de soro bovino ou tripsina suína contaminados com o SVV. O nome do vírus tem sua origem no *Seneca Creek State Park*, que fica próximo ao laboratório (*Neotropix, Inc.*) onde o vírus foi identificado, em Maryland.

Até 2014 havia apenas três sequências genômicas completas de SVV disponíveis em bases públicas de dados. Consequentemente, há poucos estudos com base no genoma completo do vírus, cujo protótipo foi denominado SVV-001. Esses estudos permitiram a classificação definitiva do

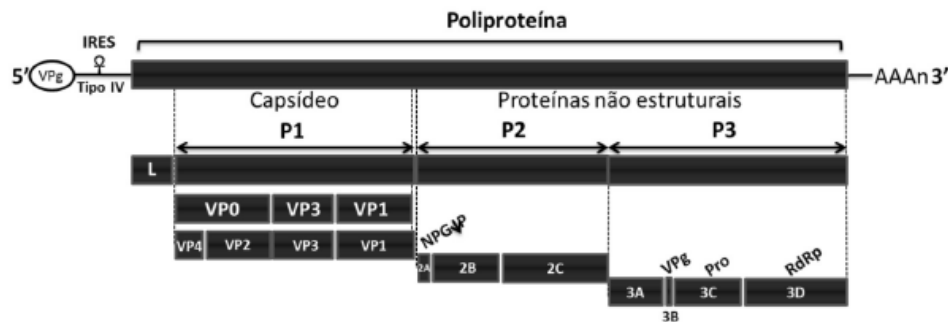
*Seneca Valley virus* como o único representante do novo gênero da família *Picornaviridae*, denominado gênero *Senecavirus*, espécie *Senecavirus A*.

### 2.1 Características do *Senecavirus A*

O SVV-001 possui o genoma típico de outros picornavírus, com o padrão L-4-3-4, ou seja, *Leader* – 4 polipeptídeos da P1 – 3 polipeptídeos da P2 – e 4 polipeptídeos da P3. O RNA genômico do SVV consiste de aproximadamente 7200 nucleotídeos (nt), além de 666 nt na extremidade 5'UTR e de 71 nt na 3'UTR, com cauda poli (A). O genoma viral possui uma única ORF que codifica uma poliproteína com cerca de 2180 aminoácidos (aa). A Figura 36.1 demonstra a representação do genoma *Senecavirus A* antes e após o processamento da poliproteína única, precursora das demais proteínas virais.

A análise da sequência dos nt 1-400 da 5'UTR do protótipo SVV-001 revelou várias estruturas secundárias. A região 5'UTR do genoma do *Senecavirus A* possui um sítio de entrada no ribossomo (*internal ribosome entry site* - IRES), cuja função é permitir a tradução do RNA viral de forma independente por meio da inibição da tradução do RNA celular. A sequência entre os nt 406-625 apresenta identidade de 57,3% com o vírus da Hepatite C (família *Flaviviridae*), sugerindo que a IRES do SVV-001 seja do tipo IV. Esse estudo corrobora resultados anteriores em que várias estruturas secundárias a partir de flavivírus e picornavírus foram identificadas. A análise da região 3'UTR do SVV-001 também revelou a presença de estruturas secundárias.

As características genômicas do *Senecavirus A* são muito semelhantes às dos vírus membros do gênero *Cardiovirus*, especialmente em relação aos polipeptídeos P1, 2C, 3C e 3D. Por outro lado, o SVV-001 difere dos cardiovírus nos polipeptídeos 2B e 3A, além da IRES, que nos cardiovírus é do tipo II. As regiões 2A, 2B, 3A e 3B do SVV-001 diferem consideravelmente daquelas de todos os outros picornavírus.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 36.1. Organização esquemática do genoma do *Senecavirus A*. No topo, a poliproteína precursora é flanqueada pela região 5'UTR, no qual a proteína ligada ao genoma (*genome-linked protein*, VPg) e o sítio interno de entrada ao ribossomo (*internal ribosome entry site*, IRES) do tipo IV estão representados; a cauda poli(A) está representada na porção terminal da região 3'UTR. Na porção intermediária da figura, a proteína *Leader* (L) e as três outras principais proteínas P1, P2 e P3 são apresentadas, com a indicação das sequências codificantes do capsídeo e das proteínas não estruturais. Na porção inferior, está representada cada uma das proteínas virais maduras após o processamento da poliproteína, com o padrão L-4-3-4 definido. O *motif* NPG\*P, conservado para os picornavírus, na porção terminal da proteína 2A está presente, assim como a VPg codificada pela 3B. A 3C protease e 3D polimerase, a qual é representada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), são apresentadas.

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

## 2.2 Histórico

### 2.2.1 Doença vesicular idiopática suína

Casos de doença vesicular de etiologia desconhecida haviam sido descritos em suínos provenientes de diferentes países. Na Nova Zelândia, na Austrália e na Flórida (EUA) os relatos ocorreram na década de 1980; a descrição de doença vesicular idiopática suína na Europa foi realizada no Reino Unido, em 2007, e na Itália em 2010. Nos relatos da Nova Zelândia e da Austrália, a ocorrência de lesões vesiculares em suínos foi associada com alimentação à base

de produtos marinhos e com a contaminação de vegetais (aipó, nabo e cenoura) com toxinas de *Sclerotinia sclerotiorum*. Já nos casos ocorridos na Flórida, no Reino Unido e na Itália, os resultados foram negativos para as doenças vesiculares clássicas (Febre Aftosa, FMD; Estomatite Vesicular, VS; Doença Vesicular Suína, SVD; Exantema Vesicular Suíno, VES), não sendo identificada(s) a(s) possível(is) causa(s) dos surtos de doença vesicular nesses animais.

Em nenhum dos surtos descritos anteriormente o *Senecavirus A* foi pesquisado. Na Nova Zelândia, Austrália e Flórida, o *Senecavirus A* certamente não foi investigado devido às datas em que os eventos ocorreram, uma vez que ainda não se tinha conhecimento do vírus naquela época. Já nos casos do Reino Unido e da Itália, as informações disponíveis referentes a esses surtos são limitadas, não sendo possível saber os motivos pelos quais o *Senecavirus A* não foi investigado, impedindo uma abordagem apropriada de ambos os eventos.

Em 2004, em Indiana (EUA), surtos de doença vesicular foram descritos em suínos alojados em

maternidade, creche e terminação. Os animais apresentavam um ou mais sinais clínicos, incluindo letargia, febre e lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas em mucosas oral e gengival, língua, focinho, casco, principalmente na região da banda coronária, além de laminite. Naquela ocasião, os agentes virais responsáveis pelas infecções vesiculares clássicas (FMD, VS, SVD e VES) foram pesquisados e não foram encontradas evidências da ocorrência de alguma dessas viroses nos rebanhos acometidos. Outro vírus, atualmente denominado *Teschovirus A* e também pertencente à família *Picornaviridae*, foi detectado em amostras de alguns animais com sinais clínicos e também em tecidos provenientes de suínos saudáveis pertencentes ao mesmo rebanho. Por se tratar de um vírus ubíquo em populações de suínos de diferentes idades em todo o mundo, a presença do *Teschovirus A* não foi associada à ocorrência das doenças vesiculares e foi considerado apenas um achado ocasional. Enfim, o agente etiológico causal das lesões vesiculares desse surto não foi identificado. Por ser de etiologia desconhecida, a doença passou a ser chamada de Doença Vesicular Idiopática Suína.

### 2.2.2 *Senecavirus A* associado à doença vesicular em suínos

Três anos após os surtos ocorridos no estado norte-americano de Indiana, Pasma, Davidson e Shaw (2008) relataram que suínos procedentes de sete granjas do Canadá e que estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares ou ulcerativas em focinho e ao longo da banda coronária, com separação dos tecidos do casco e descamação dos seus anexos. Cerca de 80% desses animais apresentavam claudicação e apenas alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de lesões vesiculares em suínos, tais como o vírus da FMD, VS, SVD e VES, resultaram negativos. Entretanto, por meio da técnica molecular da reação da polimerase em

cadeia, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), o RNA do *Senecavirus A* foi detectado no material biológico proveniente dos suínos acometidos, sendo considerado o provável agente causal da doença vesicular naquele lote de animais.

Ao longo de 20 anos (1988-2008), por meio de estudos sorológicos retrospectivos, outras 12 cepas virais, sorologicamente semelhantes ao protótipo SVV-001, foram detectadas no Laboratório Nacional de Serviços Veterinários (NVSL), em Ames, Iowa, EUA, a partir de suínos provenientes de diferentes estados norte-americanos, o que sugere que o SVV-001 e as outras cepas são comuns e estão amplamente distribuídas, tanto temporal quanto geograficamente, naquele país.

Um caso isolado de doença vesicular suína ocorreu em um animal presente em uma exposição agropecuária do estado americano de Indiana em 2012. Raspados das lesões vesiculares e fluido orofaríngeo do animal de 6 meses de idade e com sinais clínicos foram negativos por RT-PCR para os vírus da FMD, VS, SVD e VES. Foram também realizados estudos sorológicos a partir de amostras deste animal utilizando diferentes metodologias, com resultados também negativos para os vírus classicamente envolvidos com a ocorrência de sinais clínicos vesiculares em suínos. A tentativa de isolamento viral a partir das amostras de raspados das lesões vesiculares e do fluido orofaríngeo não obteve sucesso no isolamento de qualquer vírus. Entretanto, também por meio da técnica de RT-PCR, foi possível identificar o genoma do *Senecavirus A* a partir das lesões vesiculares deste animal. Esse foi o segundo estudo em que o *Senecavirus A* foi identificado em suínos com doença vesicular em que as outras doenças vesiculares clássicas haviam sido descartadas por meio do uso de testes específicos.

Desde 2015, vários outros surtos de doença vesicular associada à infecção pelo *Senecavirus A* têm sido relatados em rebanhos suínos nos EUA, especialmente em animais de reprodução, colocando em alerta as autoridades sanitárias daquele país.

### 2.2.3 *Senecavirus A* e doença vesicular em suínos no Brasil

Desde o final de 2014 e o início de 2015 surtos de doença vesicular em suínos nas fases de creche, terminação e em reprodutores foram relatados nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dois grupos de pesquisa dedicaram-se à investigação dos surtos. Os casos relatados no Paraná e em Santa Catarina foram investigados por pesquisadores brasileiros da Universidade Estadual de Londrina, enquanto os casos descritos em Minas Gerais e Goiás foram investigados por pesquisadores da Universidade de Minnesota, EUA.

O estudo realizado pelo grupo brasileiro identificou o *Senecavirus A* a partir de líquido de vesículas de suínos adultos, em lesões vesiculares de língua e mucosa oral e em raspados cutâneos de lesões vesiculares de animais de 22 a 65 dias de idade. Animais assintomáticos de granjas suinícolas, com e sem relatos da doença, também foram amostrados e resultaram negativos para todos os agentes virais pesquisados, incluindo o *Senecavirus A*. Por meio de técnicas moleculares, como PCR, RT-PCR e PCR quantitativa (qPCR), que não exigem a manipulação do agente viral, outros picornavírus (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), previamente descritos como possíveis agentes causais de lesões cutâneas em suínos e/ou já identificados em rebanhos suinícolas brasileiros, foram também pesquisados, não tendo sido detectados.

Paralelamente, os estudos conduzidos nos EUA a partir de amostras biológicas de rebanhos suínos acometidos pela doença vesicular provenientes dos estados de Minas Gerais e Goiás também confirmaram a presença do *Senecavirus A* nos animais avaliados.

Tendo como base os resultados negativos para outras importantes doenças vesiculares suínas, na epidemiologia dos surtos e na detecção do genoma do *Senecavirus A* em animais acometidos, este vírus foi considerado o mais provável agente causal

da doença vesicular suína relatada nos rebanhos brasileiros. Esses foram os primeiros relatos do *Senecavirus A* fora do território norte-americano, o que sugere que o vírus seja um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira.

### 2.2.4 *Senecavirus A* associado à síndrome multissistêmica neonatal

Simultaneamente aos casos de doença vesicular que estavam ocorrendo no Brasil, também foram relatados aumentos nas taxas de mortalidade em leitões neonatos, ou seja, entre um e cinco dias de idade, nas principais regiões brasileiras produtoras de suínos. Os sinais clínicos relatados nos leitões incluíam letargia, hiperemia cutânea, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita. Leitões que apresentaram morte espontânea foram submetidos à investigação diagnóstica e apresentaram resultados positivos para o *Senecavirus A* em diferentes órgãos/tecidos, tanto pela técnica de RT-PCR quanto por imunistoquímica. Infecções por outros agentes virais responsáveis por quadros clínicos semelhantes, como os picornavírus entéricos suínos (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), *Parvovirus suíno* (PPV), *Circovirus suíno-2* (PCV2), *Rotavirus A* (RVA), *B* (RVB), *C* (RVC) e *H* (RVH), *Vírus da diarreia epidêmica dos suínos* (PEDV), *Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos* (TGEV) e o *Deltacoronavírus suíno* (SDCoV), foram descartadas após resultados negativos em testes diagnósticos realizados a partir de amostras dos mesmos animais.

Poucos meses após os casos relatados no Brasil, a infecção pelo *Senecavirus A* também foi associada ao aumento da incidência de mortalidade em leitões neonatos nos EUA, especialmente em granjas que possuíam matrizes com histórico de lesões vesiculares.

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

### 2.2.5 *Senecavirus A* fora do continente americano

No verão de 2015, na China, suínos de granjas localizadas na província de Guangdong apresentaram doença vesicular, incluindo úlceras nas cavidades oral e nasal, anorexia, laminite e morte súbita de leitões neonatos. As amostras derivadas desses surtos foram negativas para as doenças vesiculares clássicas; entretanto, apresentaram resultados positivos para o *Senecavirus A*. Não havia, até então, estudos que relataram a infecção pelo *Senecavirus A* fora do continente americano.

### 2.3 Epidemiologia

O ano de 2015 pode ser considerado um divisor na epidemiologia da infecção pelo *Senecavirus A*. Entre os aspectos da infecção que reforçam essa teoria estão a distribuição geográfica do vírus, as categorias de produção acometidas, os sinais clínicos associados à infecção e a gravidade da doença.

Antes de 2015, o *Senecavirus A* somente havia sido descrito em animais provenientes de países norte-americanos. Até aquele ano, nos EUA, havia ocorrido apenas casos isolados de doença vesicular em suínos associada à infecção pelo *Senecavirus A*. Contudo, em 2015, o vírus foi descrito pela primeira vez fora da América do Norte, ampliando a sua distribuição geográfica. No Brasil, onde em praticamente cinco meses o vírus se disseminou por rebanhos de todos os principais estados brasileiros produtores de suínos, o *Senecavirus A* foi descrito como agente etiológico de doença vesicular em suínos nas fases de creche, terminação e em reprodutores, além de ter sido associado pela primeira vez à doença multissistêmica em leitões neonatos. A partir de então, surtos da infecção pelo *Senecavirus A* em leitões de até uma semana de idade passaram a ser relatados também nos EUA. Ainda em 2015 houve a primeira descrição do *Senecavirus A* fora do continente americano, causando doença vesicular em matrizes e morte em leitões neonatos na província de Guangdong, China.

### 2.4 Vias de eliminação e transmissão do *Senecavirus A*

Apesar de ter sido demonstrada a circulação do *Senecavirus A* em rebanhos suínos dos EUA desde o final da década de 1980 - a ocorrência de surtos em outros países (Brasil e China) e os sinais clínicos associados à infecção -, pouco se sabe sobre a origem do *Senecavirus A*, seus reservatórios naturais, vias de transmissão e patogenia da infecção.

Após diversos surtos da infecção pelo *Senecavirus A* terem sido relatados em suínos durante o verão de 2015 nos EUA, 2.033 amostras de fluido oral de suínos assintomáticos provenientes de 25 estados norte-americanos foram investigadas pela técnica de RT-PCR para a identificação do RNA do *Senecavirus A* e apenas 1,2% das amostras avaliadas, provenientes de 5 estados diferentes, foram positivas para o vírus. Por outro lado, o RNA do *Senecavirus A* foi amplificado a partir de diferentes amostras biológicas de suínos de engorda/terminação com doença vesicular. Líquido vesicular e áreas com lesões vesiculares de animais naturalmente infectados apresentaram alta carga viral ( $2 \times 10^7$  a  $1,2 \times 10^{11}$  cópias genômicas/mL), sugerindo que o contato direto entre animais com lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas e indivíduos suscetíveis provavelmente represente uma das mais importantes vias de transmissão do vírus.

A excreção do *Senecavirus A* também foi demonstrada em amostras de fezes tanto de leitões que apresentavam sinais clínicos multissistêmicos, incluindo diarreia, quanto de suínos de engorda/terminação com lesões vesiculares. Adicionalmente, testes de imunistoquímica e de RT-PCR revelaram a presença do *Senecavirus A* no epitélio urinário de leitões com doença multissistêmica, o que sugere que a urina possa ser uma possível fonte de contaminação em unidades produtoras de leitões acometidas pela infecção. Portanto, fezes e urina de animais infectados pelo *Senecavirus A* possivelmente contribuem para a disseminação viral tanto por meio de transmissão direta, pelo contato entre animais de uma mesma baia, quanto indireta, na qual o agente viral contamina o ambiente, impactando na epidemiologia da infecção.

Um estudo realizado em 2015 em granjas suinícolas com e sem histórico de doença vesicular detectou e isolou pelas técnicas de RT-PCR quantitativa e isolamento em cultivo celular, respectivamente, o *Senecavirus A* a partir de amostras de intestino delgado e fezes de ratos provenientes das granjas com histórico da infecção. No mesmo estudo, o RNA do vírus também foi detectado em moscas domésticas coletadas em granjas acometidas e em uma granja sem histórico clínico da presença de animais com doença vesicular. A detecção de RNA do vírus em moscas domésticas e a partir de amostras biológicas provenientes de ratos, bem como o isolamento de partículas virais viáveis em amostras de intestino delgado e fezes dos roedores sugerem que essas espécies possam desempenhar algum papel na epidemiologia da infecção.

Um estudo conduzido no Brasil investigou o *Senecavirus A* em 10 leitões neonatos, dos quais 7 tinham entre 1 e 2 dias idade. Todos os leitões incluídos naquele estudo apresentaram sinais clínicos agudos da infecção e morreram espontaneamente. As lesões patológicas e a detecção do *Senecavirus A* por RT-PCR e por imunistoquímica em múltiplos tecidos/órgãos dos sete leitões recém-nascidos de idade sugerem a possibilidade de transmissão vertical. Entretanto, estudos adicionais e complementares devem ser realizados no contexto dessa linha de pesquisa para confirmar essa via de transmissão.

## 2.5 Morbidade e mortalidade nas diferentes categorias de produção de suínos

As taxas de morbidade e mortalidade de doença associada ao *Senecavirus A* variam de acordo com as categorias de produção acometidas. Os surtos de doença associada ao *Senecavirus A* disseminam-se rapidamente entre os rebanhos. Dentro de um lote ou de cada rebanho onde há infecção pela primeira vez, as taxas de morbidade variam entre 4 e 70%, na dependência do conjunto de sinais clínicos apresentados e da faixa etária/categoria dos animais. Não há relatos da ocorrência

de novos surtos em granjas previamente acometidas. Acredita-se que, posteriormente, há tendência da infecção tornar-se endêmica, com a maioria dos animais assintomáticos e a manifestação de sinais clínicos apenas nos animais não infectados previamente, soronegativos ou, até mesmo, com baixos títulos de anticorpos.

Na dependência da região geográfica e dos rebanhos de origem, os surtos da doença apresentaram morbidade entre 0,5 e 5% para animais na fase de creche e de 5 a 30% para terminação e reprodutores. Excepcionalmente são relatadas taxas maiores de morbidade em matrizes, podendo chegar a 60% em algumas granjas. As taxas de morbidade têm reflexos negativos expressivos na produtividade, uma vez que, em muitas granjas onde a doença vesicular foi relatada, a população de animais era relativamente grande. Em alguns casos a população total de suínos era de aproximadamente 30 mil, incluindo animais de diferentes categorias de produção (A. A. ALFIERI, comunicação pessoal). Em relação à mortalidade nessas categorias, de acordo com produtores e/ou responsáveis por granjas das principais regiões brasileiras produtoras de suínos, as taxas foram baixas ( $\pm 0,2\%$ ) e de difícil mensuração, uma vez que a doença geralmente não ocasiona a morte de animais adultos, que podem se recuperar após a remissão dos sinais clínicos.

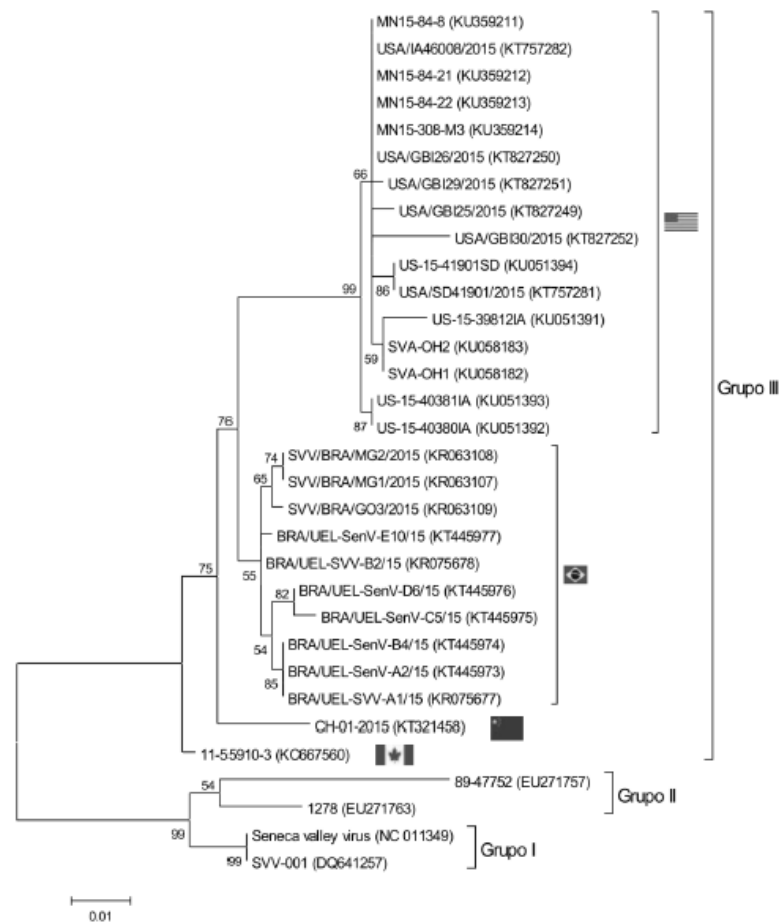
Para animais de maternidade as taxas de morbidade e mortalidade aumentam consideravelmente, em especial em leitões com 1 a 4 dias de idade. Nos casos de primo-infecção nessa faixa etária, as taxas de morbidade podem chegar a até 70%, enquanto as taxas de mortalidade variam entre 15 e 30%. Entretanto, a manifestação dos sinais clínicos e as altas taxas de mortalidade são transitórias; a mortalidade volta ao normal em 2 a 3 semanas após o início da síndrome.

## 2.6 Epidemiologia molecular

Após a ocorrência e/ou o aumento da incidência de surtos de doença associada ao *Senecavirus A*

*cavirus A* nos EUA, Brasil e China, sequências genômicas completas do vírus foram estabelecidas a partir de cepas virais originadas em cada um desses países. Conseqüentemente, algumas inferências sobre a epidemiologia molecular do *Senecavirus A*, ainda que de maneira limitada, podem ser realizadas. As sequências genômicas completas de *Senecavirus A* disponíveis até o final de 2015 apresentam, aproximadamente, 94% a 98% de similaridade entre si nas suas sequências de nt e de aa, respectivamente. As menores identi-

dades foram encontradas entre a cepa protótipo SVV-001 e uma cepa de origem norte-americana determinada em 2015. A partir da análise do gene da VP1, as cepas de *Senecavirus A* conhecidas até então se agrupam em três grupos distintos, onde o grupo I contém o protótipo SVV-001, o grupo II contém as cepas norte-americanas identificadas entre 1988 e 1997, e o grupo III possui as cepas de *Senecavirus A* originárias do Brasil, Canadá, China e EUA identificadas entre 2011 e 2015 (Figura 36.2).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 36.2. Relação genética entre as cepas de *Senecavirus A* disponíveis em bases públicas de dados (GenBank) identificadas nos EUA, Brasil, China e Canadá, desde 1988 até 2016. A árvore filogenética, construída a partir de 540 pb da região VP1 do *Senecavirus A*, indica o agrupamento das cepas do vírus em três clusters, de acordo com o país e o período de identificação.

## 2.7 Sinais clínicos e lesões

### 2.7.1 Animais de creche, terminação e reprodutores

A associação de doença clínica com o *Senecavirus A* é recente e, portanto, pouco se conhece sobre a biologia e patogenia do vírus, como o seu sítio primário de replicação e período de incubação. Com base nos relatos descritos no Brasil, EUA e China, os sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* em suínos são clinicamente indistinguíveis daqueles causados pelos vírus classicamente associados à doença vesicular (FMD, VS, SVD, VES), em que a formação de vesículas nas regiões de mucosa oral, focinho e pés e a ocorrência de febre são características comuns.

Os sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* em suínos alojados nas fases de creche e terminação e em reprodutores podem ser lesões vesiculares íntegras semelhantes a aftas, preenchidas com fluido; essas vesículas permanecem íntegras por um curto período de tempo (em alguns casos por poucas horas) e rapidamente se rompem, apresentando-se como úlceras epiteliais. As lesões são comuns em cavidade oral, em focinho e nas extremidades dos membros. Adicionalmente, também podem aparecer vesículas cutâneas. O aparecimento de vesículas pode ser antecedido por um curto período de anorexia e febre (40,3°C–40,8°C), entretanto, febre parece não ser um evento comum. Os sinais clínicos persistem por um período curto, geralmente entre 10 e 20 dias, na dependência do tamanho da população de suínos da granja. As infecções bacterianas secundárias podem agravar o quadro clínico.

Em animais de creche, terminação e em reprodutores, as lesões macroscópicas surgem, inicialmente, como áreas esbranquiçadas que, posteriormente, evoluem para a formação de vesículas. As lesões vesiculares são comuns em cavidade oral, principalmente na mucosa oral, na gengiva, na língua e nos lábios; em focinho e em extremidades dos membros, principalmente no espaço interdigital e na região da borda coronária dos

cascos, podendo-se observar a separação da coroa do casco, o desprendimento das úngulas de seus anexos e, conseqüentemente, laminite. Os animais podem apresentar lesões vesiculares íntegras, preenchidas com fluido seroso, serosanguinolento ou, em casos em que há infecção bacteriana secundária, purulento. Após a ruptura, as lesões apresentam-se como úlceras epiteliais que podem ou não estar recobertas por exsudato serofibrinoso. Como em outras doenças vesiculares, a cicatrização das úlceras inicia-se cerca de 7 dias após o aparecimento, e a reparação completa do tecido epitelial se completa após cerca de 2 semanas. Não são observadas outras alterações macroscópicas.

As alterações microscópicas descritas em animais dessas categorias incluem a observação de hiperqueratose ortoqueratótica e paraqueratótica em membros, além de ulceração focal contendo debris celulares, neutrófilos íntegros e degenerados em meio à fibrina. Na derme, foi observado discreto infiltrado inflamatório perivascular composto por neutrófilos, linfócitos e plasmócitos acompanhado de edema e tecido de granulação. Ulcerações com características morfológicas semelhantes foram observadas em cavidade oral e focinho. Entretanto, os estudos com base em alterações microscópicas em suínos de creche e terminação e reprodutores acometidos pelo *Senecavirus A* são limitados e investigações histopatológicas mais complexas da infecção em animais dessas categorias devem ser realizadas.

A manifestação dos sinais clínicos resulta na dificuldade de movimentação e locomoção dos animais acometidos, principalmente devido à laminite, o que impede o deslocamento até os comedouros. Adicionalmente, as lesões da cavidade oral não permitem que os animais se alimentem adequadamente. Conseqüentemente, ocorre a piora da eficiência da conversão alimentar e a queda abrupta do ganho de peso diário dos animais. Não se pode deixar de destacar a questão de bem-estar dos animais acometidos que se torna, invariavelmente, comprometida.

Outro agravante importante nos impactos da infecção é que animais de terminação com lesões

vesiculares ativas e/ou cicatrizadas na linha de abate são desviados para inspeção e não podem mais ser exportados e/ou são processados como produto submetido à cocção. Essa conduta de inspeção sanitária contribui consideravelmente com aumento nos custos da doença clínica para o produtor e, com isso, aumenta a importância da infecção. Portanto, as perdas na produtividade dos rebanhos devido à doença vesicular ocasionada pelo *Senecavirus A* podem ser expressivas, com impactos econômicos negativos que se refletem em toda a cadeia produtiva.

### 2.7.2 Maternidade

Na maternidade, os sinais clínicos apresentados por matrizes são semelhantes àqueles descritos anteriormente. Entretanto, leitões de até uma semana de idade podem apresentar sinais clínicos distintos daqueles descritos para suínos de outras faixas etárias. Em leitões neonatos, especialmente entre 1 e 4 dias de idade, os sinais clínicos são mais graves e incluem letargia, hiperemia cutânea, sialorreia, diarreia, sinais neurológicos e/ou morte súbita. A maioria dos animais acometidos nesse período de idade vem a óbito em pouco tempo (1 a 2 dias) após o início dos sintomas. Nos leitões que sobrevivem, os sinais clínicos persistem por 3 a 10 dias e depois desaparecem. Entretanto, esses animais apresentam taxas ineficientes de conversão alimentar, ganho diário de peso e crescimento, caracterizando-se como refugos. Geralmente, os leitões acometidos são mais suscetíveis a outras infecções, tanto por outros agentes virais quanto por outras classes de micro-organismos, como bactérias e protozoários. Na maioria das granjas acometidas, a síndrome multissistêmica associada à infecção pelo *Senecavirus A* persiste por 2 a 3 semanas. Em algumas granjas com maior número de leitões alojados, a taxa de mortalidade regular nessa categoria animal pode se manter aumentada por até 4 semanas.

Em leitões neonatos, as alterações macroscópicas incluem lesões ulcerativas e/ou crostosas

cutâneas multifocais em diferentes localizações anatômicas, incluindo a região ventral da mandíbula, metacarpo, vulva, articulação metatarsofalangeana e de banda coronária; impressão das costelas na superfície pleural dos pulmões; edema pulmonar; congestão dos vasos meníngeos; hemorragias petequiais dos rins; gengivite e glossite diftérica e/ou necrotizante fezes líquidas, indicativo de diarreia, foram observadas no intestino delgado de leitões. Outros achados são a presença de vesículas cutâneas íntegras ou rompidas, congestão da mucosa do intestino delgado, esplenomegalia e onfalite. Adicionalmente, os estômagos dos leitões costumam estar cheios de leite, o que afasta a possibilidade de inanição como causa dos sinais clínicos, especialmente a letargia e/ou morte súbita.

Entre as alterações microscópicas em leitões, pode-se observar gengivite necrotizante; estomatite necrotizante; queilite necrotizante com degeneração balonosa de células epiteliais; dermatite necrotizante; depleção linfóide em tonsilas, baço e linfonodos; miocardite linfocítica; edema e congestão pulmonar e pneumonia intersticial; degeneração balonosa do epitélio transicional da bexiga e dos ureteres. Pode, ainda, ser observada vacuolização das células epiteliais superficiais de intestino delgado de leitões com histórico clínico de diarreia e atrofia, achatamento e fusão das vilosidades intestinais. Em sistema nervoso central os achados incluem encefalite linfoplasmática, congestão cerebral e cerebelar.

### 2.8 Imunidade

Os títulos de anticorpos específicos contra o *Senecavirus A* foram investigados tanto em condições experimentais quanto em infecção natural; entretanto, são poucos os estudos direcionados à essa linha de investigação. O primeiro estudo a avaliar a imunidade específica para o vírus foi conduzido a partir de infecção experimental de suínos, que apresentaram soroconversão no 6º dia pós-infecção (dpi), mesmo não apresentando sinais clínicos de doença. O perfil da resposta humoral foi estabelecido com base no teste de ELISA indireto, em que a IgM

específica para o *Senecavirus A* foi detectada a partir do 5<sup>o</sup>-6<sup>o</sup> dpi e manteve a concentração máxima até 14 dpi. A partir de então, a concentração sérica de IgM passou a declinar até títulos indetectáveis aos 21 dpi. No mesmo estudo, títulos séricos de IgG desenvolveram-se tardiamente e mostraram forte resposta positiva 21 dpi e mantiveram-se altos por todo o período do experimento (57 dias). Em outro estudo experimental conduzido em suínos de 9 semanas de idade, os títulos de anticorpos contra o vírus, detectados pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), foram  $\geq 640$  em cerca de 15 dpi.

A soroconversão para o *Senecavirus A* foi demonstrada, pela técnica de IFI, em suínos naturalmente acometidos pela infecção, com títulos de anticorpos variando entre 160 a 1.280 em 2 a 3 semanas após o surto clínico da doença. Outro estudo, de caráter longitudinal, avaliou a dinâmica da resposta imune (IgG) para o *Senecavirus A* em infecção natural, a partir de matrizes e em suas respectivas leitegadas, pelo teste de ELISA indireto específico para a detecção de anticorpos contra a proteína VP1 do vírus. A soroconversão ocorreu em 100% das matrizes em que o RNA do *Senecavirus A* foi detectado, independentemente de apresentarem ou não os sinais clínicos da infecção. Os títulos de anticorpos IgG anti-VP1 do *Senecavirus A* aumentaram significativamente na 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> semanas após o início dos sinais clínicos e atingiram um *plateau* que perdurou até o final do período observacional, cuja duração total foi de 6 semanas.

No mesmo estudo, 3 semanas após o início da doença clínica, o RNA viral em amostras de soro dos mesmos animais alcançou número de cópias não mais detectável pelo sistema de RT-PCR utilizado no estudo, sugerindo que a viremia possa ter sido reduzida pela presença de anticorpos VP1-neutralizantes. Ainda nesse estudo, a avaliação da resposta imune IgG-específica foi também realizada em leitões provenientes dessas mesmas matrizes. Os títulos de IgG no soro dos leitões foram maiores ( $p \leq 0,05$ ) durante a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas após o início do surto, quando comparados aos títulos observados entre a 4<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> semanas após o aparecimento dos sinais clínicos.

Por outro lado, não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) ao longo do período observacional nos títulos de IgG entre leitões provenientes de matrizes com ou sem sinais clínicos. Entretanto não há, até o momento, estudos com base no período de viremia e excreção do *Senecavirus A* em suínos infectados natural ou experimentalmente, bem como no potencial de atividade neutralizante de anticorpos anti-VP1 do *Senecavirus A*, sendo necessárias informações adicionais para a abordagem apropriada sobre a imunidade induzida pela infecção.

## 2.9 Diagnóstico

Os poucos estudos já realizados com o objetivo de diagnóstico do *Senecavirus A* utilizaram, principalmente, a técnica molecular de RT-PCR. Knowles e Hallenbeck (2005) descreveram a técnica da *pan*-PCR como sendo de grande valor para a identificação inicial de novos candidatos de picornavírus. Entretanto, essa técnica torna-se dispendiosa devido ao grande número de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), especialmente aqueles com bases degeneradas e/ou alternativas, necessários para o seu desenvolvimento.

Outras técnicas de RT-PCR convencionais foram estabelecidas e tiveram como alvo para amplificação regiões conservadas do genoma viral, como a 5'UTR e os genes VP1 e 3D do *Senecavirus A*. Adicionalmente, a RT-PCR quantitativa, tanto com *SYBR Green* quanto com *TaqMan*, e o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) também são metodologias alternativas utilizadas para a detecção e/ou quantificação do RNA do *Senecavirus A*. Ambas as técnicas têm mostrado serem rápidas, específicas e sensíveis para a detecção do RNA do *Senecavirus A*, permitindo o diagnóstico a partir de diferentes tipos de amostras biológicas; entretanto, esses métodos são de alto custo e exigem equipamentos diferenciados e conhecimento técnico específico para a sua execução, o que pode representar fatores limitantes para a sua implementação na rotina diagnóstica de laboratórios veterinários.

Técnicas sorológicas de diagnóstico para o *Senecavirus A* também já foram descritas, incluindo o ELISA indireto, ELISA competitivo e IFI. As técnicas foram desenvolvidas utilizando anticorpos monoclonais específicos para o *Senecavirus A* ou com a proteína VP1 recombinante do vírus. A vírus neutralização (VN) é outra técnica possível de ser empregada para o diagnóstico da infecção pelo *Senecavirus A*; a realização dessa técnica depende da utilização de cultivo celular e de vírus infectivo e com título conhecido. A leitura do resultado final da VN pode ser realizada após 2 a 3 dias de incubação.

A imunistoquímica com anticorpos monoclonais também é outra técnica já estabelecida e utilizada por diferentes pesquisadores. Entretanto, a imunistoquímica, o ELISA competitivo e a VN são metodologias menos utilizadas na rotina laboratorial em relação às demais técnicas moleculares e sorológicas disponíveis.

Independentemente da técnica diagnóstica a ser empregada, o médico veterinário deve estar sempre atento para a ocorrência de doenças vesiculares em animais de produção que são de comunicação obrigatória. Com isso, o profissional deve imediatamente relatar os sinais clínicos e as lesões aos órgãos de defesa sanitária animal local e regional para que outros testes diagnósticos diferenciais oficiais, especialmente para a Febre Aftosa, possam ser realizados e para que, assim, as medidas cabíveis em cada situação específica possam ser imediatamente adotadas.

## 2.10 Controle e profilaxia

Atualmente não existem vacinas disponíveis no mercado para a profilaxia da infecção pelo *Senecavirus A*. Com isso, o manejo sanitário deve incluir medidas de controle e profilaxia que envolva tanto a granja quanto os animais e o ambiente. As medidas devem ser conduzidas com o objetivo principal de evitar a introdução do agente etiológico nos rebanhos e, naqueles rebanhos onde a infecção já tenha se estabelecido, evitar a disseminação do

agente infeccioso entre os demais animais das distintas categorias presentes no mesmo lote/rebanho.

A introdução de um agente infeccioso em uma unidade de produção pode ser prevenida por meio da adoção de medidas rígidas de biossegurança. A entrada de veículos, pessoas, animais e alimentos nas unidades de produção deve ser controlada com muito rigor. A área de circulação de veículos, de um modo geral, em torno da granja, deve ser limitada a áreas afastadas dos barracões onde os animais ficam alojados. O transporte de animais deve ser realizado, preferencialmente, sempre pelos mesmos veículos. No caso de reposição de animais, o ideal é que sejam adquiridos de granjas livres dos agentes infecciosos de importância em sanidade suínica e mantidos em quarentena antes de sua incorporação ao rebanho.

Nas granjas já positivas para o *Senecavirus A*, além das medidas anteriormente citadas, devem ser adotadas a limpeza e desinfecção rigorosas das instalações e equipamentos, a adoção de vazios sanitários e de sistema *all in-all out*. A eficácia de desinfetantes contra o *Senecavirus A* ainda não é bem conhecida. Uma vez que os sinais clínicos ocasionados pela infecção pelo *Senecavirus A* são muito semelhantes àqueles causados pelo vírus da Febre Aftosa, os cuidados devem ser tomados considerando a possibilidade de circulação do vírus da Febre Aftosa, incluindo os protocolos de desinfecção. Isso inclui o uso de hidróxido de sódio, carbonato de sódio, ácido cítrico a 0,2%, aldeídos e agentes oxidantes, como o hipoclorito de sódio, entre outros. Três desinfetantes comerciais à base de água sanitária, derivados fenólicos e composto quaternário de amônia e aldeído que têm sido utilizados contra o *Senecavirus A* foram avaliados em 5 diferentes superfícies, como cimento, borracha, plástico, aço inoxidável e alumínio e em diferentes temperaturas (4°C e ≈25°C). Os resultados mostraram que a água sanitária diluída na proporção 1:20 (hipoclorito de sódio 5,25%) foi eficaz na inativação do vírus em qualquer temperatura e em qualquer uma das 5 superfícies avaliadas. O desinfetante à base de derivados fenólicos não foi efetivo contra o vírus em qualquer uma das temperaturas, enquanto

os resultados obtidos a partir do desinfetante à base de composto quaternário de amônia e aldeído ficaram entre os produtos à base de água sanitária e aquele composto por derivados fenólicos.

O monitoramento da circulação do agente infeccioso deve ser realizado por meio de exames diagnósticos periódicos conduzidos em amostras biológicas de animais sintomáticos e assintomáticos dos diferentes sítios da unidade de produção. O uso de animais sentinelas, ou seja, a introdução de animais suscetíveis na granja também pode ser adotada, desde que com muito critério. Para animais de maternidade, especialmente leitões com até 1 semana de vida, deve-se garantir a ingestão de colostro de qualidade em quantidade adequada e um ambiente apropriado que proporcione conforto e bem-estar aos recém-nascidos e à matriz.

Um estudo conduzido nos EUA com o objetivo de avaliar medidas de biossegurança e de entrada da infecção em uma granja suinícola sugeriu que, entre os eventos que, hipoteticamente, representaram alto risco de introdução de novo patógeno na granja estavam os trabalhadores, a movimentação interna de pessoal e o acesso de animais domésticos e roedores às áreas de alojamento dos suínos. Outro estudo realizado em granjas com e sem sinais clínicos da infecção pelo *Senecavirus A* identificou e/ou isolou o RNA viral a partir de amostras biológicas provenientes de roedores e moscas domésticas capturados nas granjas, sendo ambos considerados potenciais vias de introdução e/ou disseminação do vírus para os rebanhos. Embora a extensão da transmissão do *Senecavirus A* a partir de outros animais não seja conhecida, o controle de roedores, moscas e a limitação do acesso de animais domésticos às áreas de criação dos suínos pode se constituir em importante medida de controle e prevenção da infecção.

### 2.11 Considerações finais

Em 2012, a Associação de Saúde Animal dos EUA (*United States Animal Health Association* – USAHA) elaborou uma resolução na qual

o *Senecavirus A* e a doença vesicular idiopática suína foram incluídos como importantes focos de estudos, particularmente devido aos sinais clínicos semelhantes com os da Febre Aftosa. A USAHA sugeriu ainda o desenvolvimento e a implementação de planos para minimizar as consequências de lesões vesiculares não associadas às doenças exóticas de animais encontrados em suínos daquele país, reforçando a importância sanitária e econômica desse patógeno como causador de uma potencial doença emergente em suínos. Em 2016, o Departamento de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agriculture* – USDA) divulgou uma lista de recomendações, procedimentos e responsabilidades no manejo de propriedades suspeitas de apresentarem a circulação do *Senecavirus A* no sentido de garantir que investigações por doenças exóticas de animais ocorram adequadamente e visando medidas de prevenção de disseminação de doenças de comunicação obrigatória.

No Brasil, em julho de 2015, o Departamento de Saúde Animal (DAS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Circular nº 018/2015/CGI/DIPOA/DAS com orientações de procedimentos a serem adotados frente a quadros clínicos de lesões vesiculares em suínos. O documento também orienta os veterinários dos Departamentos de Inspeção Federal sobre como proceder nos casos de abate de lote de suínos que apresentam animais com lesões suspeitas. Contudo, com o propósito de evitar possíveis interpretações incorretas com relação às condutas a serem adotadas é fundamental a padronização de procedimentos dentro e entre as unidades produtoras de suínos.

O *Senecavirus A* é um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira e ainda pouco se conhece sobre as suas propriedades biológicas e sobre a sua epidemiologia. Assim, estudos adicionais sobre a infecção por esse vírus, tanto em condições naturais quanto experimentais, são necessários para elucidar aspectos importantes da fisiopatogenia da infecção, bem como para propor medidas efetivas de controle e profilaxia da doença.

## 6.2 Artigos técnicos

### 6.2.1 *Senecavirus A* e doença vesicular idiopática suína

LEME, R. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A.

**Revista Porkworld**, Ano 19, Número 92, Setembro/Outubro, p. 88-92, 2015.



The image shows the cover of the magazine 'PORKWORLD'. At the top, it says 'REVISTA DE SUINOCULTURA Nº 92 - R\$ 30,00' and 'www.porkworld.com.br'. The main title 'PORKWORLD' is in large white letters. To the right is a globe icon. In the center, a green banner reads 'agrocere 70 anos' and 'VOCÊ VÊ, VOCÊ CONFIA!'. Below the banner, four men are standing on a staircase. At the bottom, there are three green boxes with text: 'SENECAVÍRUS A: Novo vírus preocupa veterinários. Cadeia deve atuar para controlar infecção', 'USDA: Produção em alta em 2016', and 'DINAMARCA: Conheça o segredo da suinocultura mais eficiente do planeta'. The Safeway logo is in the bottom right corner.

REVISTA DE SUINOCULTURA Nº 92 - R\$ 30,00  
www.porkworld.com.br

**PORKWORLD**®

agrocere  
**70**  
anos  
VOCÊ VÊ,  
VOCÊ CONFIA!

**SENECAVÍRUS A:**  
Novo vírus preocupa veterinários. Cadeia deve atuar para controlar infecção

**USDA:**  
Produção em alta em 2016

**DINAMARCA:**  
Conheça o segredo da suinocultura mais eficiente do planeta

Safeway



# Senecavírus A e doença vesicular idiopática suína

Diante deste novo evento sanitário e considerando a importância da produção de suínos no Brasil, é importante que os pesquisadores brasileiros atuem de forma conjunta para combater a doença.

Raquel da Arruda Leme, Alice Fernandes Affler, Amauri Alcindo Affler

## Produção de suínos x sanidade

Na produção de suínos a sanidade é um dos aspectos mais importantes de toda a cadeia produtiva. Infecções de caráter endêmico ou epidêmico podem ocasionar perdas econômicas na produtividade e, conseqüentemente, na lucratividade da produção por interferir diretamente em parâmetros utilizados para aferir o desempenho da atividade. Na dependência dos agentes etiológicos envolvidos nos processos infecciosos, que podem variar em diferentes classes (bactérias, vírus, protozoários) e no tipo de infecção (singular ou infecções mistas), da virulência da(s) cepa(s) infectante(s), da taxa de infecção e da faixa etária e/ou categoria

animal mais susceptível podem ser observadas variações consideráveis nas taxas de morbidade e de mortalidade dos rebanhos. Ganho de peso e conversão alimentar são outros dois importantes parâmetros da produção que são diretamente comprometidos negativamente em situações de infecções de caráter endêmico ou epidêmico, agudo ou crônico.

Além das infecções sistêmicas, várias infecções podem ainda comprometer, com maior frequência, sistemas específicos como respiratório, entérico, reprodutivo e nervoso. Apesar de não serem frequentes, algumas infecções caracterizam-se por ocu-

sionarem lesões epiteliais. Grande impacto negativo em parâmetros produtivos pode ser observado quando o micro-organismo apresenta potencial imunodepressor. Nessas circunstâncias, os sinais clínicos podem ser extremamente diversificados dificultando o diagnóstico. Enfim, a dependência do agente etiológico envolvido no processo infeccioso uma grande variedade de sinais clínicos pode ser observada nos animais acometidos. Nesse artigo damos destaque especial a um processo infeccioso que tem como principal característica o desencadeamento de lesões vesiculares epiteliais.

## Infecções vesiculares

Algumas infecções virais, em geral após um breve período de viremia, apresentam epiteliotropismo e caracterizam-se por promover a formação de vesículas que podem evoluir para úlceras em epitélio e mucosas. Além dos transtornos que as doenças vesiculares ocasionam nos animais infectados, essas infecções assumem importância epidemiológica de maior magnitude uma vez que a Febre Afosa, considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como a mais importante doença animal, particularmente em virtude de seu grande potencial de transmissibilidade, também é uma doença vesicular. Com isso, todas as

doenças que evoluem com a formação de vesículas em epitélio e mucosas devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de Febre Afosa.

Dentre as principais doenças vesiculares em animais de produção, e seus respectivos agentes etiológicos, destacam-se a Febre Afosa (vírus da febre afosa, família Picornaviridae); Estomatite Vesicular (vírus da estomatite vesicular, família Rhabdoviridae); Doença Vesicular Suína (vírus da doença vesicular suína, família Picornaviridae); Exantema Vesicular Suíno (vírus do exantema vesicular suíno, família Caliciviridae). Outras infecções que ocasionam

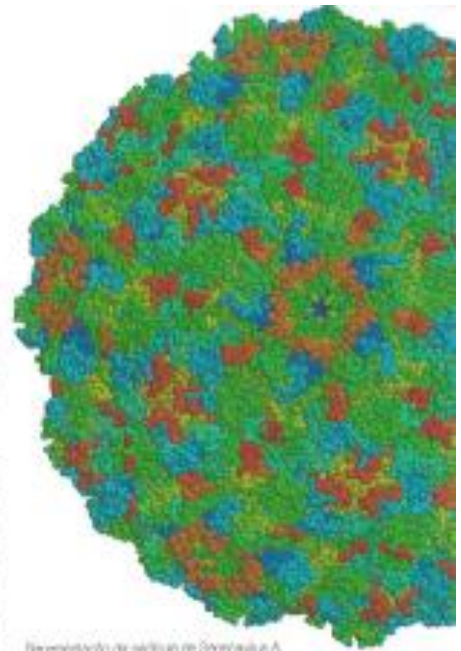
lesões epiteliais com características vesiculares podem ocorrer em animais de produção, porém com frequências de ocorrência e potencial patogênico e até mesmo de transmissibilidade muito inferiores, particularmente em comparação à Febre Afosa. Este é o caso do parvovírus e do calicivírus G, que, com frequência muito esporádica, já foram associados a lesões vesiculares cutâneas em suínos. O aparecimento de lesões vesiculares pode também estar associado a causas não infecciosas, como as intoxicações por micotoxinas como a aflatoxina, zearalenona, fumonisina, deoxivalenol e a toxina T-2.

## Senecavirus A

O Seneca Valley Virus (SVV), como foi inicialmente denominado, foi isolado pela primeira vez em Gaithersburg, cidade localizada no estado de Maryland, nos Estados Unidos da América (EUA), em 2002, a partir de cultivo celular contaminado. Presume-se que o vírus tenha sido introduzido no cultivo celular pelo uso de soro bovino ou tripesina suína contaminados com o SVV. O genoma completo da cepa protótipo do senecavirus, denominada SVV-01, foi estabelecido em 2005, o que permitiu a sua classificação definitiva como a única espécie representante do novo gênero da família Picornaviridae, denominado gênero Senecavirus.

Em 2014, uma nova nomenclatura foi proposta para o SVV para estar em consonância com a nomenclatura definida para as outras espécies pertencentes a outros gêneros de picornavírus. Assim, o Seneca Valley Virus passou a ser denominado Senecavirus A.

Desde a sua primeira descrição são realizados estudos enfocando as propriedades biológicas e sorológicas do vírus, bem como na sua epidemiologia em rebanhos suínos de diferentes estados norte-americanos. Com base nestes estudos, os suínos foram considerados hospedeiros naturais do Senecavirus A, ao qual não foi, inicialmente, estabelecida uma patologia específica.



Representação da estrutura do Senecavirus A.

## Doença vesicular x Senecavirus A

Em 2004, em Indiana, EUA, foram descritos surtos de doença vesicular em suínos de maternidade, creche e terminação. Os animais apresentavam um ou mais dos sinais clínicos de letargia, febre e lesões vesiculares íntegras e/ou rompidas em mucosas oral e gengival, língua, focinho, casco, principalmente na região da banda coronária, além de laminitite. Naquela ocasião, as infecções vesiculares clássicas (febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular suína e esmatema vesicular suína) foram pesquisadas e não foram encontradas evidências da ocorrência de alguma dessas viroses nos rebanhos acometidos. Outro vírus, inicialmente denominado teschovírus A, foi detectado

em amostras de alguns dos animais doentes e também em tecidos de suínos saudáveis presentes no mesmo rebanho. Por se tratar de um vírus ubíquo em populações de suínos de diferentes idades em todo o mundo, a presença do teschovírus A não foi associada à ocorrência das doenças vesiculares e foi considerado apenas um achado acidental. Enfim, neste surto o agente etiológico causal das lesões vesiculares não foi identificado. Por ser de etiologia desconhecida, a doença passou a ser chamada de Doença Vesicular Idiopática Suína.

Três anos após os surtos ocorridos no estado norte-americano de Indiana, em 2007, suínos procedentes de sete granjas do Canadá e que



Lesão vesicular localizada na borda de um animal com Doença Vesicular Idiopática Suína do estado americano de Indiana, EUA.



Animais de propriedade canadense que apresentaram lesões vesiculares ulcerativas em região de focinho e banda coronária dos cascos e do esmatema oral (04 cascos) que foram diagnosticadas como o Senecavirus A.

estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares ou ulcerativas em focinho e ao longo da banda coronária, com separação dos tecidos do casco e descamação dos seus anéis. Cerca de 80% destes animais apresentavam claudicação e apenas alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de lesões vesiculares em suínos tais como os vírus da febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular suína e do esmatema vesicular suína resultaram negativos. Entretanto, por meio da técnica molecular da reação em cadeia pela polimerase, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), o Senecavirus A foi detectado nos suínos acometidos, sendo considerado o provável agente causal da doença vesicular neste lote de animais.



Um caso isolado de doença vesicular suína ocorreu em um animal presente em uma exposição agropecuária do estado americano de Indiana em 2012. Raspados das lesões vesiculares e fluido oro-faríngeo do animal de 6 meses de idade e com sinais clínicos foram negativos por RT-PCR para os vírus da febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular suína e do esantema vesicular suíno. Foram também realizados estudos serológicos a partir de amostras deste animal utilizando diferentes metodologias, com resultados também negativos para os vírus classicamente envolvidos com a ocorrência de sinais clínicos vesiculares em suínos. A tentativa de isolamento viral a partir das amostras de raspados das lesões vesiculares e do fluido oro-faríngeo falhou em isolar qualquer vírus. Entretanto, por meio da técnica de RT-PCR, foi possível identificar o Senecavírus A a partir das lesões vesiculares deste animal. Este foi o segundo estudo em que o Senecavírus A



Lesões ulceroativas em região ínterdigital e vesículas em tecido do suíno de 6 meses de idade produzidas pelo Senecavírus A.

foi identificado em suínos com doença vesicular em que as outras doenças vesiculares clássicas haviam sido descartadas por testes específicos.

Até 2015 não havia descrição do Senecavírus A em outros países do mundo a não ser os EUA. Casos de Doença Vesicular

Idiopática Suína haviam sido relatados: Nova Zelândia, na Austrália e na Flórida EUA, na década de 80, e na Itália em 2011. Nesses surtos, as doenças vesiculares clássicas foram descartadas, porém o senecavírus não foi pesquisado em nenhum desses casos.

## Brasil: Senecavírus A e doença vesicular em suínos

Em fevereiro de 2015 surtos de doença vesicular em suínos nas fases de creche e terminação foram relatados nos estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná. De acordo com informações estruturais, após tomar conhecimento dos casos clínicos que estavam ocorrendo no campo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), providenciou a realização de exames laboratoriais para o rastreamento de doenças vesiculares clássicas com resultados negativos para todos os vírus avaliados. Após ter conhecimento sobre os surtos de doença vesicular de etiologia desconhecida em rebanhos suínos de diferentes estados do país, uma equipe multidisciplinar de pesquisadores do Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no estado do Paraná, dedicou-se em investigar as causas da doença. De acordo com os relatos recebidos, até 30% dos animais de rebanhos acometidos apresentavam sinais clínicos. Baseando-se em revisão bibliográfica científica e na descrição detalhada dos casos que estavam ocorrendo no Brasil, realizada por médicos veterinários de campo, a equipe de pesquisadores da UEL passou a considerar o Senecavírus A como o possível agente causal dos surtos descritos de doença vesicular em suínos. A partir daí, um



Lesões ulceroativas em caso de suíno proveniente do estado de Goiás produzidas pelo Senecavírus A por Lachin et al., 2015.

estudo foi desenhado com base na análise de sequências do genoma do vírus disponíveis em bases públicas de dados e um novo marcador molecular foi incluído na técnica de RT-PCR, que foi então padronizada para a identificação do vírus.

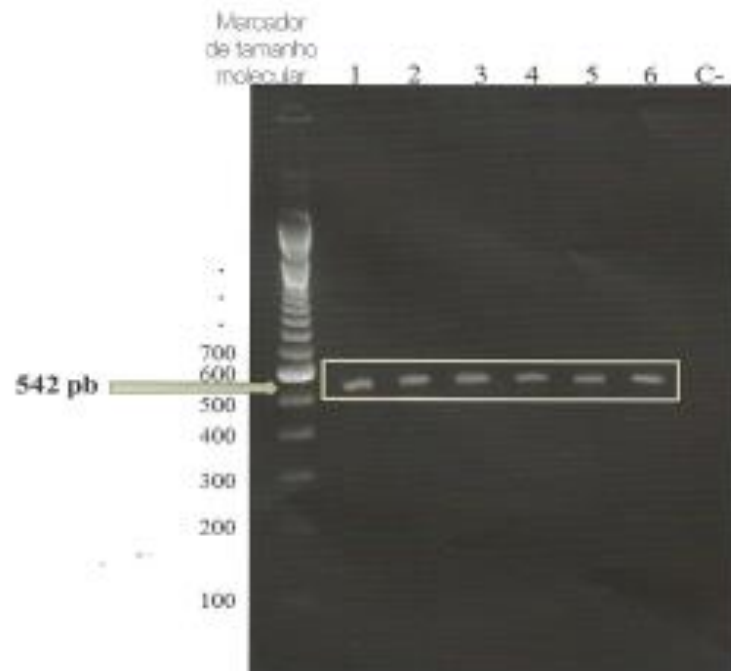
O estudo permitiu a identificação do Senecavirus A a partir de líquido de vesícula de suínos afetados, em lesões vesiculares de língua e mucosa oral e em raspados cutâneos de lesões vesiculares de animais de 22 a 65 dias de idade. Para efeitos de diagnóstico diferencial, outros picornavírus (teschovírus A, sapelovírus A e enterovírus G) previamente descritos como possíveis agentes causais de lesões cutâneas em suínos e já identificados em rebanhos suínos brasileiros foram também pesquisados neste estudo, não tendo sido encontrados.

Os rebanhos suínos brasileiros não são vacinados contra a febre aftosa, estomatite vesicular e doença vesicular suína, o que torna os rebanhos altamente suscetíveis às infecções por estes vírus. Estas três doenças são infecções altamente contagiosas e que se disseminam rapidamente entre os animais dos rebanhos acometidos, sendo responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade. Desta maneira, a infecção de rebanhos de suínos por um destes agentes virais causaria surtos de grandes proporções, pois a população suína não tem imunidade contra estes vírus. Adicionalmente, é comum que a ocorrência destas doenças não se limite apenas a alguns rebanhos, mas dissemine-se também para rebanhos vizinhos incluindo, nos casos da febre aftosa e da estomatite vesicular, rebanhos de outras espécies animais. Entretanto, tais fatos não foram relatados quando os veterinários e/ou produtores foram questionados. Portanto, além dos exames oficiais realizados pelo LANAGRO/MAPA, a partir de amostras semelhantes e no mesmo período, para o rastreamento da infecção pelo vírus da febre aftosa e outros vírus causadores de lesões vesiculares apresentarem resultados negativos, as infecções vesiculares clássicas também foram epidemiologicamente descartadas para estes surtos.

Baseando-se nos resultados negativos para outras importantes doenças vesiculares suínas, na epidemiologia dos surtos e na detecção do genoma do Senecavirus A em animais acometidos, este vírus foi considerado como o mais provável agente causal da doença vesicular suína relatada nos rebanhos brasileiros. Esta foi a primeira detecção molecular do Senecavirus A fora do território norte-americano, o que sugere que o vírus seja um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira.



Lesões vesiculares ulceradas de forma e local vesicular do suíno provenientes do sítio diagnosticado com o Senecavirus A pelo Lantz - UEL.



Eletróforose em gel de agarose com produtos da amplificação por RT-PCR do genoma do Senecavirus A por meio de técnica de RT-PCR. Marcador de tamanho molecular em lanes da base (M); Casos 1, 2, 3 e 4 produtos amplificados a partir de amostras vesiculares e ulceradas de forma e local de quatro animais. Casos 5 e 6, produtos amplificados a partir de líquido de vesícula de um suíno. Casos 7, 8, febre aftosa negativa do teste.



## Senecavírus A x importância clínica e econômica

Os sinais clínicos apresentados por suínos com a infecção pelo Senecavírus A são semelhantes aos das outras doenças vesiculares conhecidas. Resumidamente, os animais apresentam lesões vesiculares íntegras semelhantes a aftas, preenchidas com fluido, ou rompidas, que se apresentam como úlceras epiteliais. Estas lesões são comuns em cavidade oral, principalmente na mucosa oral, na gengiva e na língua, em focinho e em extremidades dos membros, principalmente na região da banda coronária dos cascos, podendo-se observar a separação da borda do casco e o desprendimento das unhas de seus arcos. Também podem aparecer vesículas na pele. Febre parece não ser um evento comum, embora tenha sido relatado em alguns casos. As infecções bacterianas secundárias podem agravar o quadro clínico.

A manifestação dos sinais clínicos resulta na dificuldade de movimentação e locomoção dos animais acometidos, principal-

mente devido à laminação, o que impede o deslocamento até os comedouros. Adicionalmente, as lesões da cavidade oral não permitem que os animais se alimentem adequadamente. Conseqüentemente, ocorre a piora da eficiência da conversão alimentar e queda abrupta do ganho de peso diário dos animais. Não se pode deixar de destacar a questão de bem-estar dos animais acometidos que se torna, invariavelmente, comprometida.

Os surtos da doença vesicular pelo Senecavírus A não se disseminam rapidamente entre rebanhos. Entretanto, dentro de um lote ou de cada rebanho onde há a infecção, as taxas de morbidade variam entre 25 e 30%, na dependência do conjunto de sinais clínicos apresentados. No Brasil, na dependência da região geográfica e dos rebanhos de origem, os surtos da doença apresentaram morbidade entre 0,5 e 5% para animais na fase de creche e de 5 a 30% para terminação; a taxa de mortalidade foi baixa

( $\approx 0,2\%$ ) e difícil de mensurar, uma vez que a doença geralmente não ocasiona a morte de animais adultos, que podem ser recuperados após a cessação dos sinais clínicos. As taxas de morbidade têm reflexos negativos expressivos para a produtividade uma vez que, em muitos granjas onde a doença vesicular foi relatada, a população de animais era relativamente grande. Em alguns casos a população total de suínos era de aproximadamente 30 mil, incluindo animais de diferentes categorias de produção. Não é difícil deduzir que as perdas na produtividade dos rebanhos devido à doença vesicular ocasionada pelo Senecavírus A podem ser expressivas, com impactos econômicos negativos que se refletem em toda a cadeia produtiva.

É importante ressaltar que não há descrição da infecção pelo Senecavírus A em humanos não se caracterizando, portanto, como uma zoonose e, com isso, não há risco para a saúde pública.

## Perspectivas

A identificação do Senecavírus A em rebanhos suínoclas brasileiros gerou uma série de perguntas ainda sem respostas. Assim, o estudo realizado pelo Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da UEL

foi apenas o primeiro passo na investigação deste agente e da doença vesicular associada à infecção. Entre os estudos a serem realizados, espera-se elucidar como o vírus ingressou no Brasil, quais as principais

categorias de animais acometidos; avaliar possíveis diferenças na patogenia e patologia da infecção em animais de diferentes faixas etárias e/ou categorias; medidas eficazes de controle e profilaxia; entre outras.

## Conclusões

Os casos de infecção pelo Senecavírus A descritos no Brasil ocasionaram lesões vesiculares epiteliais de menor intensidade em relação às doenças vesiculares clássicas que acometem a espécie suína. Tanto a epidemiologia da infecção quanto a taxa de ataque, relatadas por médicos veterinários de campo, também foram muitas distintas daquelas esperadas para as doenças vesiculares tradicionais. Contudo, por apresentarem todas as características de uma doença infecciosa viral emergente, as infecções ocasionadas pelo Senecavírus A devem sempre ser consideradas diante de mudanças sanitárias em suínos que evoluem com formações ve-

siculares epiteliais. Com isso, o rastreamento epidemiológico, o diagnóstico e a adoção e avaliação de medidas de controle e profilaxia para essa nova infecção viral nos rebanhos suínos brasileiros não podem ser negligenciados. Também se faz necessário e urgente a realização de estudos que objetivem incrementar os nossos conhecimentos a respeito do vírus e das características clínicas e epidemiológicas da infecção.

Concluímos que por estar sob o manto de um evento sanitário novo, anteriormente não descrito no país, e considerando a importância da cadeia produtiva dos suínos tanto para o agronegócio quanto para a economia bra-

sileira, todos os atores envolvidos nessa cadeia de produção animal incluindo os técnicos, criadores, funcionários, agentes oficiais de vigilância sanitária animal, e também dos laboratórios de diagnóstico e pesquisadores brasileiros devem atuar de forma conjunta com o objetivo principal de combater melhor a infecção e desenvolver e avaliar a eficácia das medidas de controle, profilaxia e de biosegurança externa e interna.

Paulo de André Leme, Raul Fernandes Alves, Arnan Ricardo Amorim  
Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

## 6.2.2 Os impactos da infecção pelo *Senecavirus A* na suinocultura brasileira

LEME, R. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A.

Publicado em: Engormix (<http://pt.engormix.com/>)

(Disponível em:

<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/impactos-infeccao-pelo-senecavirus-t2-170/165-p0.htm>)

02/12/2015 OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA - Engormix

Suinocultura

Home Fatura Artigos Técnicos Contato Profissionais Notícias Eventos

Suinocultura / Artigos Técnicos / Saúde

OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA

Publicado em: 02/12/2015

Autoria.: Raquel de Arruda Leme, Alice Fernandes Afefi, Anouad Alzaid Afefi.

A identificação do Senecavirus A movimentou a suinocultura brasileira.

A infecção ocasionada pelo vírus pode provocar sinais clínicos que acometem peixes econômicos em todas as categorias da criação de suínos.

Desde o final de 2014, surtos de doença vesicular em rebanhos suínos de diferentes estados brasileiros têm sido relatados por produtores, médicos veterinários, técnicos em suinocultura e, até mesmo, por órgãos oficiais de defesa sanitária animal. Casos clínicos da doença, inicialmente denominada "itopática" devido à etiologia desconhecida, foram descritos em animais dos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os animais acometidos apresentam lesões vesiculares, semelhantes à aftas, no focinho, boca e extremidades dos membros, especialmente na região de banda coronária a casco. Clinicamente, as lesões observadas são indistinguíveis daquelas apresentadas nas infecções pelo vírus da febre aftosa e isso é o que destaca a importância do quadro clínico, uma vez que a Febre Aftosa é a doença de maior preocupação em saúde animal em todo o mundo e constitui-se em doença de comunicação obrigatória aos órgãos oficiais de defesa sanitária animal. Adicionalmente à Febre Aftosa, outras doenças virais classicamente reconhecidas por ocasionarem doenças vesiculares em suínos e, com isso, também de comunicação obrigatória, como a Estomatite Vesicular, a Doença Vesicular Suína e o Exantema Vesicular Suíno devem sempre ser consideradas no diagnóstico diferencial.

Nos surtos relatados nos rebanhos suínos brasileiros, as doenças vesiculares clássicas foram descartadas tanto por testes realizados por laboratórios oficiais quanto pela observação da epidemiologia dos surtos. A Febre Aftosa, a Estomatite Vesicular, a Doença Vesicular Suína e o Exantema Vesicular Suíno são doenças altamente contagiosas e capazes de disseminar-se rapidamente entre as espécies animais suscetíveis. Bovinos, ovinos, caprinos, além de outras espécies de animais domésticos e silvestres são suscetíveis à infecção pelos vírus da Febre Aftosa e da Estomatite Vesicular, sendo que esta também pode infectar equinos. Entretanto, a infecção dos suínos, não foram relatados casos de doença vesicular nessas ou em outras espécies animais.

A resposta para o problema relatado nos suínos do Brasil veio no início de 2015, quando a equipe do Laboratório de Virologia Animal e Laboratório Multiaxial de Saúde Animal – Unidade de Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina (LabVir – UEL) identificou por RT-PCR o genoma (RNA) do Senecavirus A em líquido de vesícula e em amostras de lesões vesiculares ulcerativas de animais de diferentes categorias de produção, incluindo creche, terminação e matrizes, de granjas situadas no estado do Paraná. Essa identificação molecular do Senecavirus A no Brasil foi imediatamente (10/03/2015) comunicada oficialmente à ADAPAR (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná). Posteriormente, o vírus foi também identificado em lesões vesiculares de suínos provenientes de outros estados como Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Em 05/07/2015 o LabVir – UEL enviou ofício à ADAPAR comunicando o primeiro isolamento em cultivo celular do Senecavirus A no Brasil demonstrando, com isso, a presença de vírus infeccioso em líquido vesicular de suíno.

As consequências da infecção pelo Senecavirus A em animais de creche, terminação e matrizes são a dificuldade que os animais apresentam para se movimentarem e locomoverem devido às vesículas rompidas e/ou lesões ulcerativas localizadas nos cascos. Já as vesículas/aftas no focinho e na boca dificultam a ingestão de alimentos. Desta maneira,

<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/impactos-infeccao-pelo-senecavirus-t2/170/165-p0.htm>

95

02/12/2015

OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA - Engormix

observa-se o comprometimento da rotina de alimentação e a queda na eficiência de conversão alimentar e no ganho de peso diário dos animais doentes. Animais de terminação com lesões vesiculares ativas e/ou cicatrizadas na linha de abate são desviados para inspeção e não mais podem ser exportados e/ou são processados como produto cozido. Essa conduta de inspeção sanitária contribui consideravelmente com aumento nos custos da doença clínica para o produtor e, com isso, aumentando a importância da infecção.

Até então, o comportamento clínico dos focos era semelhante àquelas relatados nos Estados Unidos da América (EUA). Entretanto, a epidemiologia era completamente distinta, pois nos EUA ocorrem apenas casos isolados. Já no Brasil, em praticamente 5 meses de evolução o vírus disseminou-se por rebanhos de todos os principais estados produtores de suínos.

#### Senecavirus A em leitões de maternidade.

Inicialmente, o que mais chamou a atenção de produtores e técnicos do setor foi a presença de suínos de creche, terminação e, até mesmo, matrizes com lesões vesiculares. Porém, concomitantemente aos surtos de doença vesicular, houve também diversos relatos de aumento repentino nas taxas de mortalidade neonatal em granjas suínocolas de diferentes regiões brasileiras. Rapidamente foi possível relacionar que os principais casos de mortalidade em leitões de até uma semana de idade estavam ocorrendo em granjas que também haviam relatado casos de doença vesicular em animais adultos, inicialmente denominada doença vesicular idiópática suína.

De acordo com os relatos de produtores e veterinários, leitões de até uma semana de idade são os mais acometidos, com sinais clínicos mais graves em animais de 1 a 4 dias de idade. Para animais de maternidade, as taxas variam entre 40 a 60% de morbidade e entre 25 a 30% mortalidade. Entretanto, a mortalidade de algumas leitagens chegou a 100% em algumas granjas. Já as taxas de morbidade em matrizes com doença vesicular nas mesmas granjas variaram entre 30 a 60%. Uma granja, excepcionalmente, relatou 90% das matrizes comprometidas.

Os leitões podem apresentar apatia, salvação excessiva, pele avermelhada, sinais neurológicos, diarreia líquida amarelada e/ou morte súbita. O uso de antibióticos de amplo espectro foi realizado na tentativa de minimizar os sinais clínicos observados, porém sem sucesso. Os animais doentes geralmente morrem em um período curto (2 a 3 dias) após o início dos sinais clínicos. Aqueles que não morrem neste período, recuperam-se, porém apresentam taxas ineficientes de conversão alimentar, ganho diário de peso e crescimento, caracterizando-se como refigos.

Assim que foi informada sobre os problemas em leitões lactentes, a equipe do LabVir – UEL passou a investigar as possíveis causas para o aumento nas taxas de mortalidade. Granjas dos estados do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul enviaram animais que apresentaram morte espontânea para que as investigações diagnósticas fossem realizadas.

Baseando-se no histórico clínico, enviado pelas granjas, uma série de agentes virais foram pesquisados nos leitões neonatos. Diferentes órgãos/tecidos foram incluídos nas análises de acordo com as lesões macroscópicas, identificadas durante a necropsia, e das alterações histopatológicas observadas. Amostras de coração, pulmão, baço, rim e sistema nervoso central foram analisadas. Uma vez que nas propriedades amostradas haviam relatos de presença de matrizes com lesões vesiculares o Senecavirus A também foi incluído nos testes diagnósticos das causas de mortalidade neonatal. Para esclarecer as causas da diarreia, foram pesquisados outros importantes vírus entéricos como os rotavírus suínos grupo A (RVA), B (RVB), C (RVC) e H (RVH), além dos três principais coronavírus entéricos suínos (Vírus de diarreia epidêmica dos suínos - PEDV; Vírus de gastroenterite transmissível dos suínos - TGEV; Deltacoronavírus suíno - DCCoV). Os demais agentes virais associados aos sinais clínicos relatados, e que também foram pesquisados nos fragmentos de órgãos colhidos de leitões, foram Teschovírus A, Sapelovírus A, Enterovírus G, Cirosvírus suíno tipo 2 (PCV2) e Parvovírus suíno (PPV).

Os achados de necropsia revelaram lesões em diferentes órgãos/tecidos dos animais avaliados, incluindo na cavidade oral, principalmente na mucosa oral, na gengiva e na língua (Figura 1), no fôrnio (Figura 2) e nas extremidades dos membros, principalmente na região da banda coronária dos cascos (Figura 3), podendo-se observar a separação da borda do casco e o desprendimento das unhas de seus anexas.



<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/relatagem-impactos-infeccao-pelo-senecavirus-42670115-p0.htm>

2/5



02/12/2015

OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA - Engormix



Figura 1: Lesões difusas da mucosa oral e língua de suíno proveniente de rebanho diagnosticado com o Senecavirus A, Brasil, 2015. Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina.



Figura 2: Vesículas íntegras preenchidas com fluido e lesões vesiculares ulcerativas de focinho de suínos provenientes de rebanho diagnosticado com o Senecavirus A, Brasil, 2015. Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina.



Figura 3: Lesões ulcerativas de coxim plantar de suínos provenientes de rebanho diagnosticado com o Senecavirus A, Brasil, 2015. Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina.

O LabVir – UEL detectou o RNA do Senecavirus A em diferentes tecidos/órgãos de um grande número de leitões avaliados. Nenhum dos demais vírus investigados foi detectado. Assim, o Senecavirus A passou a ser considerado o provável agente causal dos quadros clínicos apresentados pelos leitões neonatos, bem como pela expressiva taxa de mortalidade de leitões nos primeiros dias de vida.

Simultaneamente aos estudos realizados pelo grupo de pesquisadores da UEL, outro grupo de pesquisa também investigava as causas das perdas neonatais em rebanhos suínos provenientes dos estados de Minas Gerais e Goiás. As pesquisas desse grupo foram realizadas nos EUA e ratificaram os resultados obtidos por nosso grupo no Brasil. O trabalho norte-americano relata a identificação do Senecavirus A em amostras de diferentes órgãos de leitões de até 4 dias de idade provenientes do Brasil. Esse resultado reforça a possibilidade do Senecavirus A ser o agente etiológico dos sinais clínicos e mortes precoces de leitões de até uma semana de idade que foram descritas em praticamente todos os estados brasileiros com expressão na suinocultura.

#### Aspectos clínicos da infecção pelo Senecavirus A: Brasil vs. EUA.

Até este ano, o Senecavirus A só havia sido identificado nos EUA. O vírus foi isolado pela primeira vez em Gaithersburg, cidade localizada no estado norte-americano de Maryland, em 2000, a partir de meio de cultura de células. Presume-se que o vírus tenha sido introduzido no cultivo celular pelo uso de soro bovino ou tripaina suína contaminados com o SVV.

Desde a sua primeira descrição são realizados estudos enfocando as propriedades biológicas e serológicas do vírus, bem como na epidemiologia da infecção em rebanhos suínos de diferentes estados norte-americanos. Com base nestes estudos, os suínos foram considerados hospedeiros naturais do Senecavirus A, ao qual não foi, inicialmente, estabelecida uma patologia específica.

Em 2007, suínos procedentes de sete granjas do Canadá e que estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares ou ulcerativas em focinho e ao longo da banda coronária, com separação dos tecidos do casco e descolação dos seus anacos. Cerca de 80% destes animais apresentavam claudicação e apenas alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de lesões vesiculares em suínos tais como os vírus da Febre Afosa, Estomatite Vesicular, Doença Vesicular Suína e do Exantema Vesicular Suíno resultaram negativos. Entretanto, o Senecavirus A foi detectado nos suínos acometidos, sendo considerado o provável agente causal da doença vesicular neste lote de animais.

Cinco anos depois, um caso isolado de doença vesicular suína ocorreu em um animal presente em uma exposição agropecuária do estado americano de Indiana. Respostas das lesões vesiculares e fluido oro-faríngeo do animal de 8 meses de idade e com sinais clínicos foram positivos para o Senecavirus A, enquanto os outros vírus associados à doença vesicular não foram detectados nas amostras clínicas daquele animal.

Desde Julho de 2010, novos surtos de doença vesicular têm sido registrados em suínos na fase de lactação e em matrizes de diferentes estados norte-americanos. Recentemente, também foram registrados os primeiros casos de detecção do Senecavirus A em leitões dos EUA.

Comparando-se os casos descritos nos EUA e no Brasil, observam-se diferenças nas manifestações clínicas da infecção pelo Senecavirus A nos dois países. Nos EUA, a infecção manifestou-se exclusivamente como lesões vesiculares em animais mais velhos para depois haver a ocorrência em animais na fase de maternidade. Já as características da infecção pelo Senecavirus A no Brasil não permaneceram restritas a lesões vesiculares em animais de creche/lactação e matrizes. Aqui, as manifestações clínicas ocorrem simultaneamente em animais neonatos e de diferentes formas clínicas, incluindo hiperemia de pele, sinais neurológicos e, principalmente, diarreia. Até então, não havia relatos de associação entre a infecção pelo Senecavirus A e a ocorrência de diarreia, sinais neurológicos e mortalidade em leitões neonatos. Sem dúvida que o tipo de manejo, em um ou mais sítios, pode ter contribuído consideravelmente com essa diferença na forma de apresentação inicial da infecção relatada nos EUA e no Brasil.

Essas diferenças nos aspectos clínicos da infecção pelo Senecavirus A observadas em rebanhos suínos dos dois únicos países em que o vírus foi identificado levanta uma série de perguntas, que se somam àquelas já existentes. Destacam-se entre elas: i) Como o vírus chegou ao Brasil? ii) Qual ou quais as vias de eliminação do vírus? iii) Qual a forma de disseminação do Senecavirus A entre os rebanhos suínos brasileiros? iv) Por que as categorias de produção de suínos acometidos no Brasil são diferentes daquelas dos EUA. Seria apenas tipo de manejo? v) Será que a cepa de Senecavirus A circulante no Brasil é diferente daquela existente nos EUA? vi) Em caso afirmativo, o que teria ocasionado tal alteração?

Então, vários estudos ainda devem ser realizados para que essas e outras dúvidas sobre o Senecavirus A e a doença causada pela infecção possam ser esclarecidas.

#### Como prevenir a entrada do Senecavirus A no rebanho?

As palavras-chave em termos de prevenção de qualquer doença infecciosa são Biosegurança e Bioseguridade. Apesar de serem parecidas, conceitualmente as duas palavras são diferentes e não devem ser confundidas. Biosegurança refere-se à prevenção à exposição a agentes infecciosos ou produtos biológicos capazes de produzir doenças em humanos, ou seja, são procedimentos técnicos específicos que devem ser adotados por

estabelecimentos de saúde para evitar o risco biológico. Biossegurança é um conjunto de procedimentos técnicos que visam, direta ou indiretamente, diminuir, minimizar e/ou controlar os desafios gerados na produção animal frente a agentes patogênicos. Na prática, são ações técnicas, operacionais e estruturais que buscam prevenir ou controlar a contaminação dos rebanhos por agente de doenças infecciosas que possam ter impacto na produtividade e/ou na saúde dos consumidores de produtos suínos. Enquanto a biossegurança trata do risco real, a biosegurança lida também com o risco percebido.

Na prática, os conceitos de biossegurança e biosegurança devem ser aplicados adequadamente a fim de se garantir a sanidade dos rebanhos suínos, as boas condições de bem-estar animal, os índices quantitativos e qualitativos de produção e a proteção da saúde humana.

Especificamente em relação ao Senecavirus A, no momento atual, observa-se a circulação de um vírus contra o qual, muito provavelmente, os suínos brasileiros ainda não possuem imunidade específica plena. Isso explica a rápida disseminação do vírus nos rebanhos suínos brasileiros. Adicionalmente, ainda são escassos os estudos baseados nas atividades biológicas do vírus e pouco se sabe sobre as principais vias de transmissão e fontes de contaminação, bem como sobre a estabilidade da partícula viral nas condições ambientais. Assim, deve-se adotar, intensificar e monitorar medidas clássicas de biossegurança com o objetivo de mitigar riscos de entrada e de disseminação do vírus em novos rebanhos. Destacam-se entre elas a máxima restrição no trânsito de animais, pessoas e, principalmente, veículos, incluindo caminhões de transporte de animais e rações, com o objetivo de reduzir o risco de transmissão inter-rebanhos. Somam-se a estas ações a aquisição somente de animais provenientes de granjas de reprodutores de suínos certificados (GRSC) e que sejam preferencialmente negativas para o Senecavirus A. Uma das medidas fundamentais é a realização de quarentena antes da reposição e/ou introdução de novos de animais nas granjas. Essa recomendação deve ser aplicada em unidades de produção regularmente monitoradas e consideradas livres de infecção, evitando assim os riscos de introdução do vírus no rebanho. Essa medida também pode ser aplicada em granjas que já tiveram animais diagnosticados com a doença com o objetivo de minimizar a transmissão do Senecavirus A intra-rebanho, ou seja, para os animais mais jovens, provavelmente suscetíveis à infecção.

Por fim, a implementação de medidas rigorosas de limpeza e desinfecção de instalações e equipamentos, a adoção de zelo sanitário e de sistema all in – all out e o controle de vetores, roedores, e aves também são condutas que podem contribuir com a redução de disseminação do vírus inter e intra-rebanho.

#### Referências.

- ALEXANDERSEN S., KNOWLES N.J., DENKER A., BELSHAM G.J., ZHANG Z., KOENEN F. 2012. Picornaviruses. In: ZIMMERMAN J.J., KARRIKER L.A., RAMIREZ A., SCHWARTZ K.J., STEVENSON G.W. (Eds), *Diseases of Swine*, 10th ed. (John Wiley & Sons, Inc.), p. 587-620.
- AMASS S. F.; SCHNEIDER J. L.; MILLER C. A.; SHANKY S. A.; STEVENSON G. W.; WOODRUFF M. E. 2004: Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. *J. Swine Health Prod.*, 12, 192-196.
- DOHN D. G.; LEME R. A.; ALFIERI A. F.; ALBERTON G. C.; ALFIERI A. A. 2014: First report of Porcine ischaemic virus (PIV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, 46, 523-528.
- HALES L. M.; KNOWLES N. J.; REDDY P. S.; XU L.; HAY C.; HALLENBECK P. L. 2008: Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.*, 89, 1265-1275.
- KNOWLES N. J. 2005: A pan-RT picornavirus RT-PCR: Identification of novel picornavirus species. In: Abstracts of the XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Lunteren, The Netherlands; 2005 May 23-29; Abstract A06. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2005.
- KNOWLES N.J.; HALLENBECK P.L. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. In: Abstracts of the XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Lunteren, The Netherlands; 2005 May 23-29; Abstract A14. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2005.
- KNOWLES N. J.; HALES L. M.; JONES S. H.; LANGGRAF J. G.; HOUSE J. A.; SKELE K. L.; BURROUGHS K. D.; HALLENBECK P. L. 2008: Epidemiology of Seneca Valley virus: Identification and characterization of isolates from pigs in the United States. In: Abstracts of the XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Saarielkä, Inari, Finland; 2008 26th November-1st December; Abstract G2. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2008.
- LAGER K. M.; MENGELING W. L. 1994: Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6, 357-359.
- LEME R. A.; ZOTTI E.; ALCANTARA B. K.; OLIVEIRA M. V.; FREITAS L. A.; ALFIERI A. F.; ALMEIDA S. A. 2014: Senecavirus A: um novo vírus picornavírico isolado no Brasil em suínos.

02120215

OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA - Engormix

ALFIERI A. A. 2015: Senecavirus A: na emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transbound Emerg Dis.* doi:10.1111/tbed.12430.

10. PASMA T.; DAVIDSON S.; SHAW S. L. 2008: Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.*, 49, 84-85.

11. VANUCCI F. A.; LINHARES D. C. L.; BARCELLOS D. E. S. N.; LAM H. C.; COLLINS J.; MATHIAS 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.* doi:10.1111/tbed.12410.

12. SINGH K.; CORNER S.; CLARK S. G.; 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.

\*\*\*O TRABALHO FOI ORIGINALMENTE APRESENTADO DURANTE O XVI CONGRESSO ABRAVES 2016- SUINOCULTURA EM TRANSFORMAÇÃO, ENTRE OS DIAS 20 e 23 DE OUTUBRO, EM CAMPINAS, SP.

Autores


  (0) (0)

Deixe opinar nesta discussão sobre: OS IMPACTOS DA INFECÇÃO PELO SENECAVIRUS A NA SUINOCULTURA BRASILEIRA?

Engormix se reserva o direito de apagar ou modificar os comentários. [Veja mais detalhes](#)

COMENTAR

Você quer participar desta comunidade?  
Publicar artigo técnico



Maria Vasconcelos  
Community Manager

| Quem somos nós? | Anuncie em Engormix

Copyright © 1999-2016 Engormix - All Rights Reserved

6.2.3 *Senecavirus A*: uma infecção vesicular emergente em rebanhos suínolas brasileiros.

ALFIERI, A. A., LEME, R. A., ALFIERI, A. F.

VIII Simpósio Brasil Sul de Suinocultura

11 a 13 de agosto de 2015 - Chapecó, SC – Brasil.

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Suínos e Aves  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Associação Catarinense de Medicina Veterinária – Núcleo Oeste*

**ANAIS DO VIII SIMPÓSIO BRASIL  
SUL DE SUINOCULTURA E  
VII BRASIL SUL PIG FAIR**

*Embrapa Suínos e Aves  
Concórdia, SC  
2015*

## SENECAVIRUS A: UMA INFECÇÃO VESICULAR EMERGENTE EM REBANHOS SUINÍCOLAS BRASILEIROS

**Amauri Alcindo Alfieri, Raquel de Arruda Leme e Alice Fernandes Alfieri**

*Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário,  
CEP 86057-970 - Londrina, Paraná, Brasil. Cx. Postal 10011. alfieri@uel.br*

### Introdução

A sanidade dos suínos é um dos principais fatores com impactos diretos na produção suinícola. Infecções endêmicas e epidêmicas em rebanhos de suínos por interferirem diretamente em parâmetros utilizados para aferir o desempenho da atividade podem ocasionar perdas na produção, produtividade e, conseqüentemente, econômicas. Existem diferentes classes de micro-organismos (bactérias, vírus, protozoários) que podem tanto em infecção singulares quanto em infecções mistas causar perdas consideráveis nas taxas de morbidade e de mortalidade dos rebanhos. Na dependência dos agentes etiológicos envolvidos nos processos infecciosos, no tipo de infecção, da virulência da(s) cepa(s) infectante(s), da taxa de infecção e da faixa etária e/ou categoria animal mais susceptível as perdas econômicas podem ser consideráveis. Ganho de peso e conversão alimentar são outros dois importantes parâmetros da produção utilizados na cadeia produtiva do suíno que são diretamente comprometidos negativamente em situações de infecções de caráter endêmico ou epidêmico, agudo ou crônico.

As viroses têm sido apontadas como as infecções emergentes mais comuns. Nos anos recentes, uma série de diferentes vírus foi descrita em suínos. Alguns destes vírus têm sido associados a entidades ou processos patológicos específicos, enquanto outros ainda devem ser mais bem estudados com o objetivo de definir a sua importância e/ou os seus reflexos diretos e indiretos no perfil

sanitário das diferentes categorias de animais que podem estar presentes em uma granja de suínos.

### **Infecções vesiculares clássicas vs. doença vesicular idiopática suína**

As doenças vesiculares clássicas de suínos são a Febre Aftosa, a Doença Vesicular Suína, a Estomatite Vesicular e o Exantema Vesicular Suíno. Dentre estas, o Exantema Vesicular Suíno pode ser epidemiologicamente considerado menos importante, uma vez que os últimos relatos de diagnóstico da doença em suínos ocorreram na década de 50 do século passado. Por outro lado, a Febre Aftosa é considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como a mais importante doença animal, particularmente em virtude de seu grande potencial de transmissibilidade. Desta maneira, todas as doenças que evoluem com a formação de vesículas em epitélio e mucosas devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de Febre Aftosa.

Todas as doenças vesiculares clássicas de suínos são causadas por vírus. Tanto a Febre Aftosa quanto a Doença Vesicular Suína são causadas por vírus de diferentes gêneros da família *Picornaviridae*; a Estomatite Vesicular é causada pelo vírus da estomatite vesicular, família *Rhabdoviridae*; o Exantema Vesicular Suíno é causado por um calicivírus. Essas infecções diferem entre si sobre vários aspectos, entretanto, clinicamente, ocasionam sinais / sintomas indistinguíveis. Em todas essas infecções, após um breve período de viremia, os agentes virais apresentam epiteliotropismo e formam vesículas de alguns milímetros a centímetros de diâmetro. Diferentemente daquelas causadas por calor, fricção ou outras causas, as vesículas causadas por infecção viral tornam o epitélio mais inchado, esbranquiçado e necrótico, com degeneração e acúmulo de líquido entre suas células. Devido à necrose, o epitélio e mucosas afetados nas doenças vesiculares se rompem facilmente, provocando erosões conhecidas como úlceras.

Outras infecções que ocasionam lesões epiteliais com características vesiculares podem ocorrer em animais de produção, porém com frequências de ocorrência e potencial patogênico e até mesmo de transmissibilidade muito inferiores, particularmente em

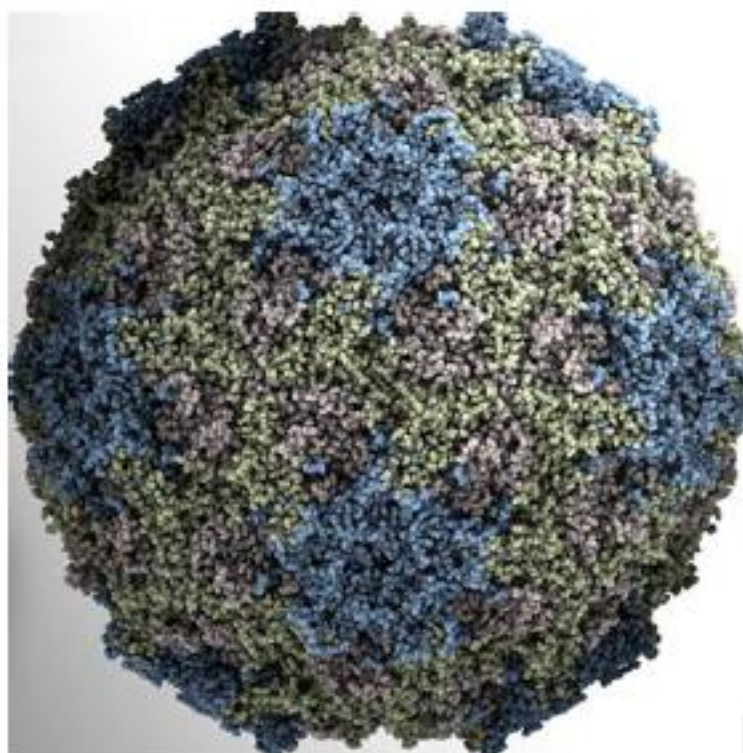
comparação à Febre Aftosa. Este é o caso do *Parvovirus suíno* e do *Enterovirus G* que, com frequência muito esporádica, já foram associados a lesões vesiculares cutâneas em suínos. Adicionalmente, as intoxicações por micotoxinas, como a aflatoxina, zearalenona, fumonisina, deoxinivalenol e a toxina T-2, podem também estar associadas ao aparecimento de lesões vesiculares.

O termo idiopatia é comumente utilizado no meio médico para referir-se a doenças cujas causas são indefinidas ou desconhecidas. Em 2004, no estado de Indiana, EUA, foram descritos surtos de doença vesicular em suínos de maternidade, creche e terminação. Os animais manifestavam lesões em mucosas oral e gengival, língua, focinho e casco, principalmente na região da banda coronária. As doenças vesiculares clássicas, como a febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular suína e exantema vesicular suíno foram descartadas após a realização de testes diagnósticos específicos com resultados negativos. O único agente viral identificado naquele surto foi o *Teschovirus A*; porém este vírus foi detectado tanto em animais sintomáticos quanto em assintomáticos do mesmo rebanho e, por se tratar de um vírus endêmico em rebanhos suínos de diversos países, a sua detecção não foi associada à ocorrência da doença vesicular. Enfim, neste surto o agente etiológico causal das lesões vesiculares não foi identificado e a doença passou a ser chamada de Doença Vesicular Idiopática Suína.

Casos de Doença Vesicular Idiopática Suína haviam sido relatados na Nova Zelândia, Austrália e Florida, na década de 80, e na Itália em 2010. Nos casos descritos nos dois primeiros países, a ocorrência de lesões vesiculares em suínos foi associada com a alimentação, destacando-se, muito provavelmente, a contaminação de vegetais (aipo, nabo e cenoura) com toxinas de *Sclerotinia sclerotiorum*. Já nos casos ocorridos na Florida e na Itália, todos os resultados foram negativos para as doenças vesiculares clássicas.

### *Senecavirus A*

O *Senecavirus A* – ou *Seneca Valley Virus (SVV)*, como foi denominado até 2014, quando foi definida uma nova nomenclatura para o vírus – foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA), em 2002. Naquela ocasião, o vírus foi identificado acidentalmente a partir de cultivo celular. O *Senecavirus A* é a única espécie representante do gênero *Senecavirus*, dentro da família *Picomaviridae* (Figura 1).



Fonte: [http://www.virology.wisc.edu/virusworld/PS10/cj\\_seneck\\_valley\\_01.jpg](http://www.virology.wisc.edu/virusworld/PS10/cj_seneck_valley_01.jpg)

Figura 1. Representação estrutural da partícula de *Senecavirus A*

Após a sua primeira descrição, uma série de estudos foi realizada nos EUA a fim de esclarecer a epidemiologia do *Senecavirus A* em rebanhos suínos de diferentes estados norte-americanos e as suas propriedades biológicas. Estudos sorológicos demonstraram que suínos são hospedeiros naturais do *Senecavirus A* não sendo, inicialmente, associada nenhuma patologia específica a este vírus.

Até 2015, apenas dois estudos detectaram o *Senecavirus A* em suínos com doença vesicular em que as infecções vesiculares clássicas foram investigadas, porém não foram encontradas. Em 2007, suínos procedentes do Canadá e que estavam sendo transportados para Minnesota, EUA, apresentaram lesões vesiculares e/ou ulcerativas em focinho e banda coronária, claudicação e alguns apresentavam febre. Todos os testes realizados para a identificação de vírus causadores de doenças vesiculares clássicas resultaram negativos. Neste surto, o *Senecavirus A* foi detectado pela técnica molecular de transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) nos suínos acometidos.

A segunda descrição do *Senecavirus A* possivelmente associado à doença vesicular ocorreu também nos EUA, mais especificamente no estado de Indiana, em 2012. O estudo descreve um caso isolado de doença vesicular suína em um animal de seis meses de idade presente em uma feira agropecuária. Assim como no caso anterior, as doenças vesiculares clássicas foram descartadas após resultados negativos em exames diagnósticos oficiais e as tentativas de isolamento viral a partir das amostras de raspados das lesões vesiculares e do fluido oro-faríngeo falhou em isolar qualquer vírus. Porém, raspados das lesões vesiculares deste animal foram positivos para o *Senecavirus A* na técnica de RT-PCR.

#### ***Senecavirus A*: uma doença vesicular emergente rebanhos suínos brasileiros**

A partir do final de outubro e início de novembro de 2014 iniciaram os relatos de que rebanhos suínos de diferentes estados brasileiros, incluindo Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, apresentaram animais com lesões de casco e focinho. Os sinais clínicos lembram os da Febre Aftosa, o que colocou em alerta produtores, técni-

cos e os órgãos oficiais de defesa sanitária animal. Atento às ocorrências, o Departamento de Defesa Sanitária/MAPA, por meio dos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROs), realizou os testes oficiais para as doenças vesiculares de notificação obrigatória, com resultados negativos.

Em março de 2015, a equipe do Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL) diagnosticou a infecção pelo *Senecavirus A* a partir de líquido de vesículas de suínos adultos, em lesões vesiculares de língua e mucosa oral e em raspados cutâneos de lesões vesiculares de animais de 22 a 65 dias de idade. Outros picornavírus (*Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*), previamente descritos como possíveis agentes causais de lesões cutâneas em suínos e já identificados em rebanhos suínos brasileiros, foram também pesquisados neste estudo, não tendo sido encontrados.

Esta foi a primeira detecção do *Senecavirus A* fora do território norte-americano. Os resultados do estudo sugerem que o *Senecavirus A* é o mais provável agente causal da doença vesicular suína relatada nos rebanhos brasileiros, o que indica que o vírus é um agente infeccioso emergente na suinocultura brasileira.

### Sinais clínicos

Assim como ocorre com as infecções virais já conhecidas, o *Senecavirus A* é clinicamente indistinguível das doenças vesiculares clássicas. Os animais apresentam lesões vesiculares íntegras semelhantes a aftas, preenchidas com fluido, ou rompidas, que se apresentam como úlceras epiteliais. Estas lesões são comuns em cavidade oral, principalmente na mucosa oral, na gengiva e na língua (Figura 2), em focinho (Figura 3) e nas extremidades dos membros, principalmente na região da banda coronária dos cascos (Figura 4), podendo-se observar a separação da borda do casco e o desprendimento das unhas de seus anexos. Também podem aparecer vesículas na pele. Febre parece não ser um evento comum, embora tenha sido relatada em alguns casos. As infecções bacterianas secundárias podem agravar o quadro clínico.



Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina

**Figura 2.** Lesões diféricas de mucosa oral e língua de suíno proveniente de rebanho diagnosticado com o *Senecavirus A*, Brasil, 2015



Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina

**Figura 3.** Vesículas íntegras preenchidas com fluido e lesões vesiculares ulcerativas de focinho de suínos provenientes de rebanho diagnosticado com o *Senecavirus A*, Brasil, 2015



Fonte: Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina

**Figura 4.** Lesões ulcerativas de coxim plantar de suínos provenientes de rebanho diagnosticado com o *Senecavirus A*, Brasil, 2015

As principais consequências do aparecimento de lesões são a dificuldade de movimentação e locomoção, assim como da ingestão de alimentos. Desta maneira, o que se observa é a redução do ganho de peso diário dos animais. Adicionalmente, o desconforto é muito grande e o bem estar dos animais torna-se extremamente reduzido.

De acordo com os relatos recebidos por médicos veterinários e técnicos, na maioria dos animais os sinais clínicos duram de duas a três semanas; após este período ocorre a remissão espontânea da doença, o que a caracteriza como uma enfermidade auto limitante.

## Conclusões

A infecção pelo *Senecavirus A* em rebanhos suínos do Brasil tem ocasionado lesões vesiculares epiteliais de menor intensidade em relação às doenças vesiculares clássicas que acometem a espécie suína. Entretanto, sempre que forem identificados casos de doenças vesiculares em suínos, os mesmos não devem ser negligenciados. Assim, todos os cuidados sanitários recomendados pelos serviços oficiais devem ser adotados até que se tenha o diagnóstico das causas reais do problema.

Por apresentar todas as características de uma doença infecciosa viral emergente e considerando a importância da cadeia produtiva dos suínos tanto para o agronegócio quanto para a economia brasileira, todos os técnicos, produtores, funcionários, agentes oficiais de vigilância sanitária animal, bem como os laboratórios de diagnóstico e pesquisadores brasileiros envolvidos nessa cadeia de produção animal devem atuar de forma conjunta com o objetivo principal de conhecer melhor a infecção pelo *Senecavirus A* e desenvolver e avaliar a eficácia das medidas de controle, profilaxia e de biossegurança para os nossos rebanhos.

### Referências

- ALEXANDERSEN, S., KNOWLES, N. J., DEKKER, A., BELSHAM, G. J., ZHANG, Z., KOENEN, F. 2012. Picornaviruses. In: ZIMMERMAN J. J., KARRIKER L. A., RAMIREZ A., SCHWARTZ K. J., STEVENSON G. W. (Eds), *Diseases of Swine*, 10<sup>th</sup> ed. (John Wiley & Sons, Inc.), p. 587-620.
- AMASS, S. F.; SCHNEIDER, J. L.; MILLER, C. A.; SHAWKY, S. A.; STEVENSON, G. W.; WOODRUFF, M. E. 2004: Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. *J. Swine Health Prod.*, 12, 192-196.
- DONIN, D. G.; DE ARRUDA LEME, R.; ALFIERI, A. F.; ALBERTON, G. C.; ALFIERI, A. A. 2014: First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, 46, 523-528.
- GIBBS, E. P. J.; STODDARD, H. L.; YEDLOUTCHNIG, R. J.; HOUSE, J. A.; LEGGE, M. 1983: A vesicular disease of pigs in Florida of unknown etiology. *Florida Vet. J.*, 12, 25-27.
- HALES, L. M.; KNOWLES, N. J.; REDDY, P. S.; XU, L.; HAY, C.; HALLENBECK, P. L. 2008: Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.*, 89, 1265-1275.
- KNOWLES, N. J. 2005: A pan-RT picornavirus RT-PCR: identification of novel picornavirus species. In: Abstracts of the XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Lunteren, The Netherlands; 2005 May 23-29; Abstract A08. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2005.
- KNOWLES, N. J.; HALLENBECK, P. L. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. In: Abstracts of the XIIIth Meeting of the European

Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Lunteren, The Netherlands; 2005 May 23-29; Abstract A14. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2005.

KNOWLES, N. J.; HALES, L. M.; JONES, B. H.; LANDGRAF, J. G.; HOUSE, J. A. et al. 2006: Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. In: Abstracts of the XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; Saariselkä, Inari, Finland; 2006 26th November-1st December; Abstract G2. EUROPIC: European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses; 2006.

LAGER, K. M.; MENGELING, W. L. 1994: Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6, 357-359.

MONTGOMERY, J. F.; OLIVER, R. E.; POOLE, W. S. 1987: A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease I. Field cases. *N. Z. Vet. J.*, 35, 21-26.

MUNDAY, B. L.; RYAN, F. B. 1982: Vesicular lesions in swine - possible association with the feeding of murine products. *Aust. Vet. J.*, 59: 193.

PASMA, T.; DAVIDSON, S.; SHAW, S. L. 2008: Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.*, 49, 84-85.

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

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

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

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.

## 6.2.4 Atualização sobre a situação epidemiológica do Seneca Valley virus

ALFIERI, A. A., LEME, R. A., ALFIERI, A. F.

IX Simpósio Brasil Sul de Suinocultura

09 a 11 de agosto de 2016 - Chapecó, SC – Brasil.

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Suínos e Aves  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Associação Catarinense de Medicina Veterinária - Núcleo Oeste*

# **ANAIS DO IX SIMPÓSIO BRASIL SUL DE SUINOCULTURA E VIII BRASIL SUL PIG FAIR**

*Embrapa Suínos e Aves  
Concórdia, SC  
2016*

## ATUALIZAÇÃO SOBRE A SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO SENECA VALLEY VÍRUS

**Amauri Alfieri, Raquel de Arruda Leme e Alice F. Alfieri**

*Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina  
Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade  
Estadual de Londrina, Londrina, PR*

Em medicina veterinária, particularmente com relação aos animais de produção, não é frequente o surgimento de novos patógenos que podem impactar a saúde e a produtividade das cadeias produtivas. Na produção de proteína de origem animal tanto no contexto do "Complexo Carnes" quanto também na produção de leite e seus derivados, particularmente devido às condições sanitárias que os rebanhos brasileiros atingiram, felizmente novas doenças infecciosas que podem impactar a cadeia como um todo não são constantes, porém jamais devem ser negligenciadas.

Na realidade são mais constantes aquelas variações em patógenos já conhecidos pela ciência que por meio de processos de mutação conseguem driblar a imunidade ativa dos rebanhos obtidas por meio de infecções clínicas e/ou subclínicas, programas de controle e profilaxia, incluindo as vacinações, e normas de biossegurança. Na suinocultura a circovirose suína foi uma das últimas doenças infecciosas a ser incorporada no elenco das doenças de importância em suínos que foram introduzidas no Brasil.

Mais recentemente estávamos todos, incluindo produtores, técnicos, médicos veterinários, pesquisadores e demais atores envolvidos na cadeia produtiva de suínos preocupados com a Diarreia Epidêmica Suína (*Porcine Epidemic Diarrhea* - PED). Essa doença infecciosa ocasionada por um coronavírus suíno (vírus da diarreia epidêmica suína - *porcine epidemic diarrhea virus* - PEDV) nos anos de 2014 e 2015 ocasionou um dos maiores desastres sanitários na suinocultura norte americana. A infecção alastrou-se por todo o território e, em menos de seis meses, ocasionou a morte de mais de nove milhões de leitões. Todos foram surpreendidos por um vírus já há muito conhecido na Europa e que, mais recentemente, também

estava comprometendo a suinocultura asiática. Felizmente, até então, não tivemos o ingresso desse vírus (PEDV) no território brasileiro. Hoje as autoridades sanitárias norte-americanas reconhecem que erraram ao negligenciarem a PED.

Entretanto, sem dúvida não estamos livres de PED e muito menos de outros potenciais patógenos. Devemos estar sempre alertas e vigilantes, pois os micro-organismos sempre estão nos ensinando que vigilância epidemiológica robusta é a melhor arma contra surpresas desagradáveis tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária.

Em medicina humana, no ano de 2015, tivemos o dissabor de sermos apresentados ao zikavírus. Esse arbovírus (vírus transmitidos por insetos) ainda não havia sido diagnosticado em nosso país. Muito provavelmente como um legado da copa do mundo de futebol o zikavírus encontrou no Brasil condições adequadas para a sua disseminação, sempre no vácuo da Dengue utilizando o seu vetor (*Aedes aegypti*) para se disseminar pelo país. Além de sermos surpreendidos por um novo vírus ainda não diagnóstico no território brasileiro o zikavírus foi incriminado por uma forma de apresentação clínica não relacionada de maneira usual a essa virose em humanos que é o nascimento de crianças com microcefalia.

Em medicina veterinária algo muito semelhante em termos epidemiológicos também ocorreu. Aproximadamente na segunda quinzena de outubro de 2014 iniciaram os relatos de técnicos de campo sobre a ocorrência de lesões vesiculares em suínos comprometendo animais de cria, recria, terminação e também reprodutores. Por ser de manifestação clínica vesicular inicialmente veio o receio e temor, pois infecções que culminam com doenças vesiculares são de comunicação obrigatória aos órgãos oficiais de defesa sanitária animal, particularmente devido à Febre Afosa e demais doenças vesiculares clássicas como Estomatite Vesicular, Doença Vesicular Suína e Exantema Vesicular Suíno.

Entre novembro e dezembro de 2014 a infecção disseminou-se pelos principais estados onde a suinocultura tem importância econômica no contexto do agronegócio. Em janeiro de 2015, ainda sem diagnóstico conclusivo, o MAPA realizou reunião técnica e posicionou-se frente a esse processo infeccioso, pois os diagnósticos oficiais já haviam descartado as doenças vesiculares clássicas e de

comunicação obrigatória. Porém, até então não havia um diagnóstico etiológico definitivo. Ainda em janeiro e fevereiro de 2015 relatos de campos descreviam que, principalmente, em granjas onde animais de terminação e reprodutores (matrizes) apresentaram quadro clínico vesicular observou-se a ocorrência de alta mortalidade em leitões neonatos (1 a 5 dias de idade). Algumas leitegadas apresentaram, em um período de 7 a 15 dias, até 35% de mortalidade neonatal. Clinicamente os leitões apresentaram diarreia, sinais neurológicos, lesões erosivas em mucosas e pele, inanição, definhamento e refugagem. Posteriormente, os casos de mortalidade neonatal, tentativamente denominada de Síndrome Multissistêmica com Mortalidade Neonatal, foram relacionados com a ocorrência anterior ou até mesmo concomitante de animais adultos, particularmente matrizes, com lesões vesiculares em casco e focinho.

Em 20 de março de 2015 pesquisadores do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina comunicaram à Adapar (Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Paraná) e, conseqüentemente, também ao MAPA a identificação por meio da reação de RT-PCR e de sequenciamento de nucleotídeos do produto amplificado de *Senecavirus A* (SenVA) identificado a partir de lesões vesiculares em suínos. Posteriormente, o senecavírus também foi relacionado, além da forma clássica vesicular, com os quadros clínicos de mortalidade neonatal que estavam ocorrendo em rebanhos suínos de praticamente todo o país.

Desde então o vírus disseminou-se rapidamente por praticamente todas as regiões geográficas brasileiras onde a cadeia produtiva de suínos tem importância econômica e social. A velocidade de transmissão do SenVA nos rebanhos brasileiros foi muito grande, talvez sem paralelo na suinocultura nacional. Destaca-se que, epidemiologicamente, a infecção pelo SenVA no Brasil foi muito semelhante à forma de disseminação da PED nos Estados Unidos da América (EUA) nos anos de 2014 e 2015.

Ou seja, em termos epidemiológicos assim como a medicina humana no caso do zikavírus, a suinocultura brasileira foi surpreendida com o ingresso em nossos rebanhos de um novo vírus (SenVA) ainda não identificado no país, com grande potencial de disseminação e que, além da forma clássica de apresentação, manifestou-se

também por meio de uma forma clínica ainda não descrita para esse vírus em todo o mundo.

Inicialmente, antes do relato das conquistas e evoluções no campo das novas descobertas relativas tanto ao SenVA quanto à infecção em suínos (senecavirose), é interessante relembrar um pouco da história.

O *Seneca Valley virus* (SVV), atualmente denominado SenVA, foi identificado pela primeira vez nos EUA no ano de 2002. Posteriormente, nos anos de 2006, 2008 e 2012 ocorreram relatos do vírus sendo descritos em casos de lesões vesiculares em suínos denominadas, preliminarmente, como Doença Vesicular Idiopática (DVI) tanto em suínos provenientes dos EUA quanto do Canadá. Casos de DVI em suínos já haviam sido descritos em outros países, porém sem a definição da etiologia. Até então o SenVA somente havia sido identificado em casos de lesões vesiculares ocorrido nos EUA e também no território norte americano em suínos provenientes do Canadá.

A identificação do SenVA no Brasil foi a primeira identificação deste vírus fora da América do Norte. O senecavírus é um vírus RNA de fita simples, não envelopado, com aproximadamente 25-30 nm de diâmetro, capsídeo icosaédrico e que, atualmente, está classificado na família *Picornaviridae*, gênero *Senecavirus*, espécie *Senecavirus A* (SenVA).

Após a descrição do vírus no Brasil, bem como a sua correlação com mortalidade neonatal relatos semelhantes foram realizado no EUA e na China. Devido ao grande desenvolvimento científico e tecnológico atual, nesse curto espaço de tempo, trabalhos científicos realizados no Brasil, EUA e China foram responsáveis por demonstrar, e até mesmo comprovar cientificamente, vários aspectos relacionados ao vírus e à infecção (senecavirose) propriamente dita. A sequência de nucleotídeos do genoma (RNA) completo de várias cepas de SenVA já está disponível em bases públicas de dados. Os sinais clínicos de lesões cutâneas e vesiculares foram reproduzidos por meio de inoculação experimental de cepas virais isoladas em cultivo celular em suínos em idade de creche assim como as mortalidades neonatais por meio de inoculação em matrizes gestantes. A reprodução da infecção e dos sinais clínicos por meio de inoculação experimental possibilita que definitivamente possamos relacionar le-

sões vesiculares e mortalidade neonatal em suínos com o SenVA e finalmente cumprindo todas as quatro etapas do postulado de Koch.

Sem dúvida, o ingresso desse vírus na suinocultura brasileira causou grande prejuízo econômico à cadeia produtiva como um todo. A primeira infecção em rebanhos livres determinou lesões vesiculares em animais de terminação que mesmo após a cicatrização trazia consequências, pois ao abate milhares de animais foram desviados da linha por apresentarem sinais de lesões cutâneas cicatrizadas em focinho e casco. Os episódios de mortalidade neonatal ocasionaram a morte e/ou refugagem de milhares de leitões.

No geral, após a instalação da infecção em um rebanho a senecavirose evolui por 20 a 30 dias e apresenta tendência a estabilização. Em alguns rebanhos foram descritos novos episódios ou de lesões vesiculares ou de mortalidade neonatal dois a três meses após os primeiros casos. Atualmente, muito provavelmente pelo estabelecimento de imunidade de rebanho, observa-se que a infecção apresenta tendência de tornar-se endêmica, surgindo casos esporádicos particularmente em animais com baixa ou até mesmo sem imunidade específica.

Com relação ao controle e profilaxia da infecção a principal medida para prevenir a entrada do vírus ou até mesmo a reentrada do vírus no rebanho é a adoção, a intensificação e o monitoramento de medidas rígidas de biossegurança. A implementação e monitoramento de medidas clássicas de biossegurança é a principal arma disponível para reduzir o número e a intensidade de focos. Destacam-se entre elas:

- Limpeza e desinfecção rigorosas das instalações.
- Vazio sanitário.
- Proibição ou redução ao máximo de trânsito nas granjas evitando visitas nas instalações.
- Implementação de sistemas de desinfecção de veículos.
- Evitar a presença de outros animais domésticos e silvestres.

Para granjas que precisam realizar a reposição de animais deve ser obrigatória a realização de quarentena antes da introdução de novos animais no rebanho.

Sem dúvida, os avanços em todas as áreas de conhecimento relacionadas ao SenVA e a infecção de leitões e suínos adultos por esse vírus ocorreram de forma extremamente rápida em resposta à agilidade que a cadeia produtiva suína exige, particularmente em relação aos aspectos sanitários e, principalmente, quando se trata de doenças exóticas. Com relação ao Brasil, esses relatos demonstram de forma cabal todo o potencial e capacidade dos laboratórios de pesquisa e diagnóstico de instituições brasileiras em atender de forma quase instantânea a uma importante e emergente demanda do setor produtivo.

Por fim creio que seja de grande relevância fazermos uma reflexão. O *Seneca Valley virus* ou o *Senecavirus A* realmente nos deu uma grande lição. Em hipótese alguma os nossos rebanhos estão protegidos do surgimento de um novo agente infeccioso. Fomos realmente pegos de surpresa. Estávamos nos preparando, e ainda estamos, para evitarmos a entrada do coronavírus causador da PED. De repente fomos assolados pela infecção por um vírus para o qual não tínhamos diagnóstico instalado no país. Como fator complicador inicial uma das formas de apresentação clínica da doença, a forma vesicular em animais adultos, apresenta lesões cutâneas muito semelhantes às ocasionadas pela Febre Aftosa que, de acordo com a OIE, é a principal doença infecciosa animal em todo o mundo.

A lição que fica é que devemos contar com uma defesa sanitária robusta e qualificada com sistemas rápidos e eficazes de atendimento a campo, com uma rede de laboratórios competentes e com planos de contenção e medidas de mitigação de risco testadas e avaliadas. A saúde dos rebanhos de animais de produção sem dúvida alguma é o maior patrimônio do produtor rural. Ele deve consolidá-la por meio da adoção de medidas rígidas de biossegurança nos rebanhos e o estado deve contar com uma estrutura de defesa sanitária animal competente, consolidada e sempre em expansão.

Doenças infecciosas representam a maior ameaça aos nossos rebanhos. Em um país onde mais de 1/3 do PIB é originado por atividades vinculadas ao agronegócio que geram impostos e divisas além de milhares de empregos no campo e nas cidades, no comércio e na indústria, sem dúvida a Vigilância Epidemiológica Animal deve ser tratada como matéria de segurança nacional.

O tema *Senecavirus A* e suas formas de apresentação vesicular e de mortalidade neonatal tem sido extensivamente explorado por pesquisadores de vários países com ênfase para pesquisadores de origem brasileira, norte-americana e chinesa.

Na sequência apresentamos as principais publicações relativas ao tema realizadas em periódicos científicos de prestígio internacional somente nos anos de 2015 e 2016.

### **Apoio financeiro**

CNPq e Fundação Araucária (FAP/PR).

### ***Senecavirus A* - produção científica internacional no ano de 2015**

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.

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.

JOSHI, L. R.; DIEL, 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.; DIEL, D. G. Detection of the emerging *Senecavirus A* in pigs, mice and houseflies. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015. doi: 10.1128/JCM.03390-15.

ZHANG, J.; PIÑEYRO, P.; CHEN, Q.; ZHENG, Y.; LI, G.; RADEMACHER, C.; DERSCHIED, 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.

### **Senecavirus A - produção científica internacional no ano de 2016**

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.

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.

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**, doi: 10.1128/JCM.00710-16.

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.

HAUSE, B. M.; MYERS, O.; DUFF, J.; HESSE, R. A. Senecavirus A in Pigs, United States, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1323-1325, 2016.

LEME, R. A.; OLIVEIRA, T. E. S.; ALCÂNTARA, B. K.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. F.; YANG, M.; ALFIERI, A. A. Novel clinical manifestations associated with Senecavirus A in neonatal piglets. *Emerging Infectious Diseases*, v. 2, p. 1238-1241, 2016.

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*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.011>.

MONTIEL, N.; BUCKLEY, A.; GUO, B.; KULSHRESHTHA, V.; VAN-GEELLEN, 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.

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*, 2016. doi:10.1177/0300985816653990.

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.

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, 2016.

GOYAL, S. M. Evaluation of disinfectants against Seneca Valley virus. Disponível em: <<http://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2016/03/15-187-Goyal-Evaluation-of-disinfectants-against-Seneca-Valley-virus.pdf>>. Acesso em: 07 de Junho de 2016.

## 6.3 Resumos publicados em anais de congresso

---

### 6.3.1 Molecular, pathological, and immunohistochemical evidence of *Senecavirus A*-induced infections in pigs of different age groups with vesicular disease from Brazil

LEME, R. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A.

Allen D. Leman Swine Conference, University of Minnesota, v. 42, p. 26, 2015.

## Allen D. Leman Swine Conference

### Recent Research Reports

*Volume 42*  
*2015*  
*College of Veterinary Medicine*  
*University of Minnesota*

Published by:

Veterinary Continuing Education  
<http://www.cvm.umn.edu/vetmedce>

UNIVERSITY OF MINNESOTA

**MOLECULAR, PATHOLOGICAL, AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVIDENCE  
OF *SENECAVIRUS A*-INDUCED INFECTIONS IN PIGS OF DIFFERENT AGE GROUPS  
WITH VESICULAR DISEASE FROM BRAZIL**

RA Leme<sup>1</sup>, SA Headley<sup>2</sup>, TES Oliveira<sup>2</sup>, M Yang<sup>3,4</sup>, R. Gomez<sup>2</sup>, C Feronato<sup>3,5</sup>, AF Alfieri<sup>1</sup>, AA Alfieri<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup>Laboratories of Virology and Animal Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil, [alfieri@uel.br](mailto:alfieri@uel.br); <sup>3</sup>Department of Immunology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada; <sup>4</sup>National Centre for Foreign Animal Disease, Winnipeg, Manitoba, Canada; <sup>5</sup>MSD Saúde Animal, Cotta, São Paulo, Brazil

**Introduction**

*Senecavirus A* is the single representative species of the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family (1). Studies conducted in North America (2,3) have suggested that *Senecavirus A*-induced infection might be associated with a vesicular disease of pigs known as porcine idiopathic vesicular disease (PIVD). Outbreaks of PIVD were reported from pigs of Indiana, USA (3,4) and Manitoba, Canada (2). This study investigated the participation of *Senecavirus A* in PIVD-affected pigs of different ages from distinct geographical regions of Brazil.

**Materials and methods:**

Two adult and 3 weaned pigs from 2 pig farms with PIVD from distinct cities of Paraná state, southern Brazil were investigated. Vesicular fluids (*n*=2) and scrapings of ruptured vesicles and ulcerative lesions (*n*=5) were collected for molecular diagnostics. Additionally, 10 1-4 day-old piglets that died spontaneously from 5 pig farms located in the states of Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil, *n*=1), and Santa Catarina (*n*=2) and Paraná (*n*=2), Southern Brazil, were received for diagnostic investigations. A total of 15 animals and 7 pig farms were evaluated during this study.

Routine necropsy was performed on the 10 piglets; duplicate tissue sections were selected for molecular, histopathological, and immunohistochemical, IHC (5) evaluations. RT-PCR assays were performed to detect specific amplicons of viral agents associated with vesicular and/or cutaneous diseases such as foot and mouth disease, vesicular stomatitis, swine vesicular disease (6), *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, *Esterovirus G* (7), *Porcine circovirus-2* (8), and *Porcine parvovirus* (9). A set of primers were designed to amplify a 542 bp product of the VP3/VP1 region of the *Senecavirus A* genome.

**Results:**

Significant gross pathological findings included diphtheric glossitis (*n*=6), and ulcerative lesions at the coronary band (*n*=3). Histopathology

revealed necrotizing glossitis with ballooning degeneration of epithelial cells, interstitial pneumonia, myocarditis, and lymphoplasmacytic encephalitis. IHC revealed positive immunoreactivity at the degenerated epithelium of the ulcerative lesions of the tongue of all piglets. RT-PCR assays identified *Senecavirus A* from the vesicular fluids, scrapings of the ruptured vesicles, and ulcerative lesions, as well as from multiple tissues of all piglets; all other RT-PCR assays were negative. Sequence analyses confirmed the specificity of the RT-PCR assay; phylogenetic evaluation revealed that the isolates from Brazil clustered with similar strains of *Senecavirus A* identified in North America.

**Conclusions and discussion**

The molecular, pathological, and IHC findings confirmed the participation of *Senecavirus A* in the lesions observed in these pigs. These results suggest that *Senecavirus A* was the etiological agent associated with the vesicular disease outbreaks in the 7 pig farms from 3 distinct states of Brazil. This is the first study to report *Senecavirus A*-induced infection in clinically affected pigs outside of North America; the novel primer set reported in this study was suitable for the rapid and specific molecular detection of *Senecavirus A*.

**References:**

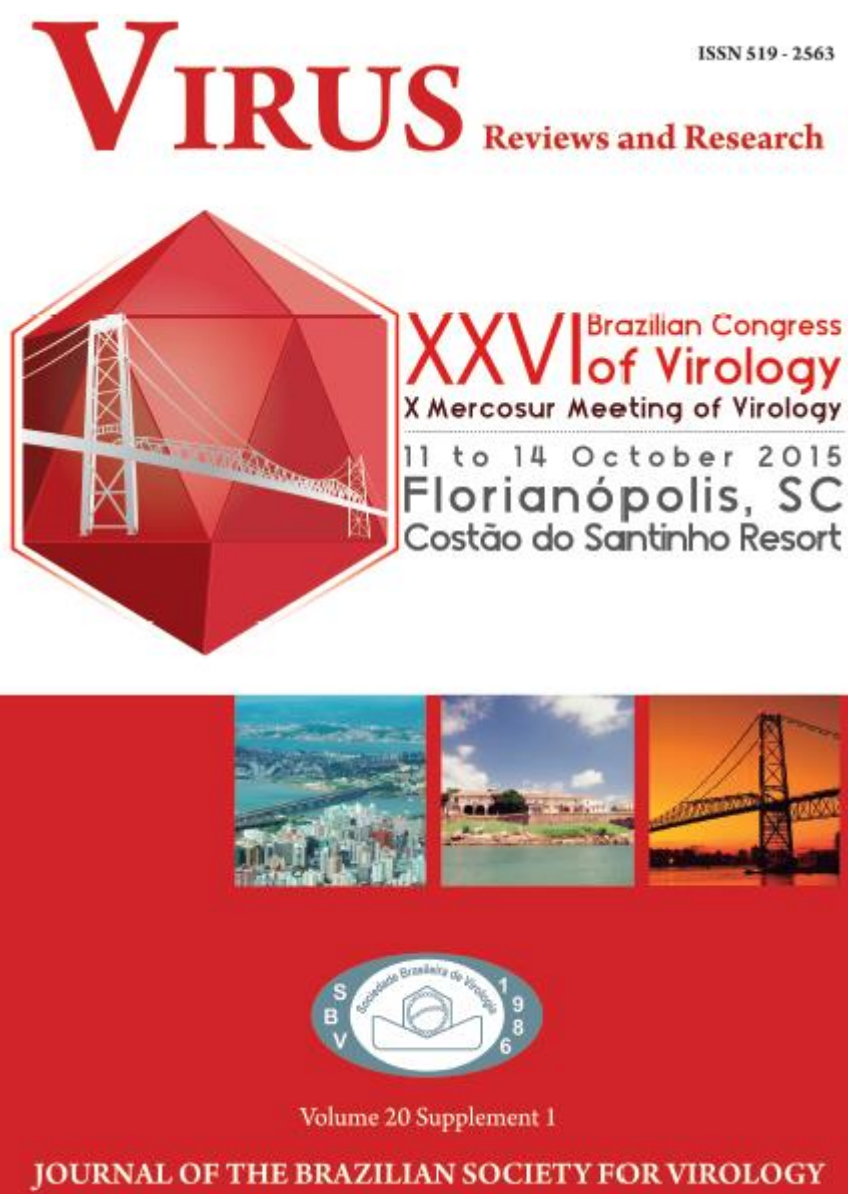
- Hales LM et al.: 2008, *J Gen Virol* 89: 1265-1275.
- Paum TS et al.: 2008, *Can Vet J* 49: 84-85.
- Singh KS et al.: 2012, *J Vet Sci Technol* 3: 1-3.
- Amass SF et al.: 2004, *J Swine Health Prod* 12: 192-196.
- Yang M et al.: 2012, *J Vet Diagn Invest* 24: 42-50.
- OIE: 2014, <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>
- Domin DG et al.: 2014, *Trop Anim Health Prod* 46: 523-528.
- McIntosh et al.: 2008, *Can Vet J* 49: 1189-1194.
- Soares et al.: 1999, *J Virol Methods* 78: 191-198.

## Apresentação oral

### 6.3.2 First report of Senecavirus A in pigs of different ages with vesicular disease in Brazil

LEME, R.A., DINIZ, J.A., ALCÂNTARA, B.K., POSSATI, F., MOLINARI, B.L.D., LORENZETTI, E., FAVERO, L.M., OLIVEIRA, M. V., ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A.

Anais do **XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology**.  
Sociedade Brasileira de Virologia, p. 27-28, 2015.



for the nucleoprotein gene of cPIV and CDV, E3 gene of CAHV-2 and glycoprotein B gene of CAHV-1. Our results demonstrate that respiratory viral infections, especially involving cPIV and/or CAHV-2 and/or CDV, and less frequently CAHV-1, are common in dog shelters in RS state, Brazil and their frequency is related to dog density, sanitary and nutrition conditions, and year season. Financial Support: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**VV109 - IMMUNOGENICITY AND EFFICACY ASSESSMENT OF AN INACTIVATED RABIES-BASED CANINE DISTEMPER VACCINE**

Budaszewski, R.F.; Canal, C.W.; Schnell, M.J.; von Messling, V.

1. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
2. THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY
3. PEI-EHRLICH INSTITUT

Rabies and canine distemper viruses are important canine pathogens and included in routine vaccination schedules. While rabies vaccines are inactivated, canine distemper virus (CDV) vaccines are live-attenuated, which carries the inherent risk of vaccine induced distemper in wild carnivore species with higher sensitivity to the virus. Many of these species are close to extinction, and the lack of a safe CDV vaccine poses a great challenge for conservation efforts. In addition, the genetic divergence of circulating CDV strains from the vaccine strains has been continuously increasing, and an update with a more recent isolate may become necessary. However, the selection and licensing of a new live-attenuated vaccine strain will be time-consuming and costly. To address these issues, we generated recombinant rabies viruses carrying the CDV fusion (F) and attachment (H) protein of the vaccine strain Onderstepoort or the recent wild type strain 5804p in addition to the rabies virus glycoprotein (G). These viruses were purified by ultracentrifugation and subsequently inactivated with beta-propiolactone. To investigate the efficacy of the different vaccine candidates, groups of ferrets were immunized twice with either the CDV wild type or the vaccine envelope protein carrying viruses or with the CDV Onderstepoort H protein alone. In addition to following the neutralizing and total anti-CDV antibody kinetics, the rabies antibody titers were also analyzed.

Three weeks after the second immunization, the animals will be challenged with the 5804p strain and the clinical course of disease will be followed. The extent of virus replication in peripheral blood mononuclear cells will be quantified and the severity of immunosuppression will be analyzed by in vitro proliferation assay. We expect to gain new insights in the relevance of genetic changes in the H protein for vaccine efficacy and in the potential of the rabies virus vector as vaccine platform. Financial Support: CAPES, DAAD.

**VV351 - FIRST REPORT OF SENECAVIRUS A IN PIGS OF DIFFERENT AGES WITH VESICULAR DISEASE IN BRAZIL**

Leme, R.A.; Diniz, J.A.; Alcântara, B.K.; Possati, F.; Molinari, B.L.D.; Lorenzetti, E.; Favero, L.M.; Oliveira, M. V.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

*Senecavirus A* (SenA) is the single representative species of *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family. Studies conducted in North America have suggested that SenA infection might be associated with a vesicular disease in pigs known as porcine idiopathic vesicular disease (PIVD). Here we report the molecular detection of SenA in PIVD outbreaks in pigs of Southern Brazilian region. From February to June, 2015, eight pig farms located in Paraná and Santa Catarina states reported PIVD outbreaks. Pig population in these farms varied of 200 to 5,000 animals and morbidity rates ranged of 20% to 90%. Weaned pigs and sows presented claudication, fluid-filled and ruptured vesicles, and ulcerative lesions on coronary band, hooves and/or snout. Clinical signs persisted in the affected animals for approximately 2 weeks and then disappeared. However, other pigs started to present the symptoms. Swabs (n=7), scrapings of ruptured vesicles and ulcerative lesions (n=5) and vesicular fluids (n=4) were collected from PIVD-affected pigs of the eight farms. In order to evaluate asymptomatic pigs for SenA infection, 14 PIVD non-affected animals within the same farms also were sampled with scrapings of skin. A total of 30 samples were collected from PIVD-affected farms. Additionally, cutaneous tissue samples (n=38) were collected from clinically healthy pigs of 5 PIVD non-affected pig herds. Nucleic acid extraction was performed using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate

methods. RT-PCR assays were performed to detect specific amplicons of viral agents associated with vesicular and/or cutaneous diseases such as *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, *Enterovirus G*, *Porcine circovirus-2* and *Porcine parvovirus*. A set of primers were designed to amplify 542 bp product size of VP3/VP1 region of SenA genome. SenA was detected from all the vesicular fluid and scraping of ruptured vesicle and ulcerative lesion samples from PIVD-affected pigs; all samples collected from asymptomatic pigs of PIVD-affected and non-affected herds did not show amplification products. Sequence analyses confirmed the specificity of RT-PCR assay; phylogenetic evaluation showed isolates from Brazil clustered with similar strains of SenA identified in North America. The results suggest that SenA was the etiological agent of the vesicular disease outbreaks in evaluated pig herds. This is the first report of SenA infection in clinically affected pigs outside of North America. Keywords: Picornavirus infections, swine, Seneca valley virus, vesicular skin disease. Financial Support: FINEP, CAPES, CNPq, and Fundação Araucária/PR.

**VV355 - DETECTION AND CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A VIRUS ENDEMIC CIRCULATION IN SUCKLING AND NURSERY PIGS IN COMMERCIAL FARMS USING INFLUENZA VACCINE**

Dias, A.S.; Gauger, P.C.; Vincent, A.L.; Kitikoon, P.; Baker, R.B.; Zhang, J.

1. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2. IOWA STATE UNIVERSITY
3. NATIONAL ANIMAL DISEASE CENTER/ UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE

Influenza vaccines in the United States have helped reducing clinical disease, but their ability to protect against infection has been inconsistent, and reservoirs that allow the viral circulation are unknown. The objectives of this study were to evaluate the level of influenza infection in suckling and nursery pigs on farms using influenza vaccination in breeding females, to determine the influenza subtype(s) present in these pigs and to compare the influenza sequences isolated and their phylogenetic relationship with the vaccine strains used in the herd. Four farms from the same production system in Midwest United States using influenza virus

vaccination in the breeding females were selected. Dams were previously vaccinated with a commercial influenza vaccine, which contained  $\delta$ -2 H1N1,  $\gamma$ -H1N1, C1-H3N2 and C4-H3N2 viruses. One week prior to onset of the sampling, an autogenous subunit product containing H3-C4, H1- $\delta$  and H1- $\gamma$  was used to vaccinate all dams. Samples were collected every other week, for a total of eight samplings. A hundred and thirty five nasal swab samples were collected from 12-17 day-old pigs by litter in each sampling and each farm, for a total of 4320 samples. Oral fluid samples were collected from the same group of pigs after transport to the nursery at approximately four weeks of age, for a total of 158 samples. All samples were submitted to real time PCR (Vet MAX™ Gold SIV Detection) and subtyping (Vet MAX™ SIV Subtyping RNA). Virus viability of positive samples on real time PCR was assessed by virus isolation. Complete genome sequencing was performed on positive samples by virus isolation and genetic sequences of influenza isolates were compared with vaccine strains. Influenza A virus was detected in 2.2% and 31% of pooled nasal swabs and oral fluid samples, respectively. H1N2 subtype was the most prevalent for nasal swab and oral fluid samples, followed by H3N2. Two nasal swab samples were submitted to complete genome sequencing, which revealed they were a human H1N2-51 subtype with PB1, PB2, PA, NS e NP segments from TRIG H3N2 isolated in 1998 and M segment from pandemic H1N1 virus. HA gene was 97.6% and 97.5% similar to the nucleotide and amino acid sequences compared to the H1- $\delta$  virus in the subunit vaccine, respectively. Results suggest that suckling and nursery pigs were susceptible to IAV circulating in the farms and suckling pigs may serve as reservoir of IAV, despite of influenza vaccination in breeding females. Financial Support: FAPEMIG, CNPq.

**VV369 - GENETIC HETEROGENEITY OF THE VP6 GENE AND PREDOMINANCE OF G6P[5] GENOTYPES IN BRAZILIAN FIELD STRAINS OF PORCINE ROTAVIRUS C**

Possatti, F.; Lorenzetti, E.; Molinari, B.L.D.; Leme, R.A.; Massi, R.P.; Otonel, R.A.A.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Porcine rotavirus C (RVC) is an important cause of enteritis in piglets, and has been considered an

## **6.4 Números de acesso em base pública de dados (GenBank) das sequências genômicas parciais (VP1) das cepas de *Senecavirus A***

---

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SenV-E10/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KT445977.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SenV-D6/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KT445976.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SenV-C5/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KT445975.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SenV-B4/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KT445974.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SenV-A2/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KT445973.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SVV-B2/15 VP1 gene, partial cds

541 bp linear RNA

Accession: **KR075678.1**

**Senecavirus A** strain BRA/UEL-SVV-A1/15 VP1 gene, partial cds

542 bp linear RNA

Accession: **KR075677.1**



## 7.1 Circular nº18/2015/CGI/DIPOA/SDA

### Circular nº18/2015/CGI/DIPOA/SDA, de 07 de Julho de 2015



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA  
Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA/MAPA  
Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA/SDA  
Coordenação-Geral de Inspeção – CGI/DIPOA

Circular nº 018/2015/CGI/DIPOA/SDA

Brasília, 07 de julho de 2015

Do: Coordenador Geral da CGI/DIPOA.

Aos: Aos Chefes de SIPOA/SISA/SIFISA.

Assunto: **Orientação de procedimentos a serem adotados frente as lesões vesiculares em suínos. Esta Circular cancela a de nº 014/2015/CGI/DIPOA.**

Senhores Chefes,

Considerando as informações do Departamento de Saúde Animal (DSA), veiculadas por meio do Memorando Circular 12/2015-DSA (anexo) e na presença de lotes de suínos com lesões vesiculares de casco e focinho, esclarecemos que:

Deve ser primeiramente avaliado pelo Médico Veterinário Oficial do SIF, se está presente a comprovação documental de atendimento, emitida por Médico Veterinário considerado competente para esse fim pelo Serviço Oficial de atenção à Saúde Animal, de forma prévia ao carregamento dos animais.

Mediante a comprovação de atendimento pelo Médico Veterinário considerado competente pelo Serviço Oficial de atenção à Saúde Animal, caracterizando o quadro clínico e epidemiológico como compatível com doença alvo dos programas oficiais do DSA, na forma definida pela IN nº 50/2013, o lote será considerado **inapto para exportação (NE)** para os destinos que apresentem restrição na Certificado Sanitário Internacional quanto a sua situação sanitária.

Mediante a comprovação de atendimento pelo Médico Veterinário considerado competente pelo Serviço Oficial de atenção à Saúde Animal, caracterizando o quadro clínico e epidemiológico como incompatível com as doenças alvo dos programas oficiais do DSA, conforme a IN nº 50/2013, os animais devem ser avaliados *ante e post mortem* na forma definida no presente documento, para fins de Certificação Sanitária Internacional.

Não havendo o acompanhamento do lote pelo "form-in" (comprovação de atendimento pelo órgão competente de saúde animal) deve ser feita a comunicação pelo SIF ao Serviço de Saúde Animal local, quanto aos achados de *ante mortem* (presença de lesões vesiculares recentes ou em resolução, morbidade em relação às cargas recebidas de mesma origem, resultado da termometria de animais com lesão, entre outros), e quanto ao diagnóstico clínico ou laboratorial do Médico Veterinário a campo. Essa notificação será feita pelo envio de cópia do boletim sanitário e demais documentos de interesse que estiverem disponíveis.

Após a execução do exame clínico de *ante mortem* pelo SIF, realizado independentemente do diagnóstico de campo e incluindo termometria dos animais com lesão vesicular, os mesmos devem ser destinados para o abate, sempre em separado dos lotes que não tiveram detecção de lesão pelo SIF.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA  
 Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA/MAPA  
 Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA/SDA  
 Coordenação-Geral de Inspeção – CGI/DIPOA

Os estabelecimentos deverão, por meio do sistema de rastreabilidade, garantir a identificação e a segregação das carcaças e de suas vísceras, com diferentes destinações autorizadas pelo serviço oficial, comprovando a adequada destinação de forma inequívoca.

Abaixo foram traçados dois fluxogramas com o objetivo de esclarecer as ações a serem adotadas:

#### Fluxograma resumido I

- 1) Recebimento de lotes de suínos **COM** lesões vesiculares e **SEM** atendimento pelo Médico Veterinário considerado competente pelo Serviço Oficial de atenção à Saúde Animal;
- 2) Realizar o *ante-mortem*, incluindo a termometria;
- 3) Os lotes de suínos com ou sem febre deverão ser destinados ao abate em separado;
- 4) Realizar o *post-mortem* sendo que:
  - a) Para os animais identificados com febre, suas carcaças e suas vísceras deverão ser condenadas;
  - b) Para os animais identificados sem febre, as lesões vesiculares devem ser removidas, suas carcaças e vísceras destinadas ao aproveitamento condicional pelo calor.
- 5) Os demais animais do lote (mesmo que não tenham apresentado lesão) referidos nas letras “a” e “b” deverão ser desclassificados para exportação.
- 6) O Serviço Veterinário local e o Serviço de Saúde Animal (SSA/SISA/SIFISA) deverão ser notificados dos achados.

#### Fluxograma resumido II

- 1) Recebimento de lotes de suínos **COM** lesões vesiculares e **COM** atendimento pelo Médico Veterinário considerado competente pelo Serviço Oficial de atenção à Saúde Animal;
- 2) Realizar o *ante-mortem*, incluindo a termometria;
- 3) Os lotes de suínos com ou sem febre deverão ser destinados ao abate em separado;
- 4) Realizar o *post-mortem* sendo que:
  - a) Para os animais identificados com febre, suas carcaças e suas vísceras deverão ser condenadas;
  - b) Para os animais identificados **SEM** febre, porém com quadro clínico e epidemiológico caracterizado como **compatível** com doença alvo dos programas oficiais do DSA, na forma definida pela IN nº 50/2013, as lesões devem ser removidas, suas carcaças e suas vísceras deverão ser destinadas de acordo com a enfermidade identificada;
  - c) Para os animais identificados **SEM** febre, porém com quadro clínico e epidemiológico caracterizado como **incompatível** com doença alvo dos programas oficiais do DSA, na forma definida pela IN nº 50/2013, as lesões devem ser removidas, suas carcaças e suas vísceras deverão ser destinadas ao aproveitamento condicional pelo calor;



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA  
 Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA/MAPA  
 Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA/SDA  
 Coordenação-Geral de Inspeção – CGI/DIPOA

- 5) Os lotes dos animais referentes as letras “a” e “b” deverão ser desclassificados para exportação.
- 6) No caso da letra “c”, os demais animais do lote (não acometidos por lesões), poderão ser objeto de exportação, ressalvado o disposto nos Certificados Sanitários Internacionais.

**Definições:**

**Notificação dos achados de ante e post mortem** = envio de Guias de Trânsito Animal (GTA) e boletins sanitários de lotes recebidos com lesão, após o preenchimento do campo exclusivo do SIP com as informações relevantes, às unidades de atendimento veterinário local e ao órgão competente da SFA, para ciência do órgão de saúde animal, e providências que entenderem cabíveis;

**Febre** = temperatura retal maior ou igual a 41°C (art. 124 do Decreto nº 30.691/52);

**Tratamento pelo calor** = binômio tempo e temperatura devidamente comprovado, por bibliografia, como suficiente para assegurar a neutralização ou eliminação de quaisquer vírus presente na carcaça e das vísceras.

**Documentos de referência:**

- BRASIL. Decreto nº. 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Portaria 711, de 1º de novembro de 1995. **Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos**. Brasília, 1995. 306p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Instrução Normativa 50, de 24 de Setembro de 2013. **Altera a lista de doenças passíveis de aplicação de medidas de defesa sanitária animal e torna as de notificação obrigatória**. Brasília, 2013.
- BRASIL. DECRETO Nº 5.741, DE 30 DE MARÇO DE 2006. Regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei no 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e dá outras providências.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 17 DE JANEIRO DE 2000 Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 47, DE 18 DE JUNHO DE 2004 Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade Suídea.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA  
Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA/MAPA  
Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA/SDA  
Coordenação-Geral de Inspeção – CGI/DIPOA

- MAPA. SDA. Manual do Sistema Nacional de Informação Zoonosológica. 1ª Edição: 2013.
- MAPA.SDA. Plano de Ação para Febre Aftosa: atendimento à notificação de suspeita de doença vesicular. 2009
- Memo Circular 12/2015-DSA. Ocorrência de Mortalidade em suínos. 13/02/2015.
- OIE. Código de Animais terrestres. Disponível no site: [www.oie.int](http://www.oie.int)

Esta Circular cancela a de nº 014/2015/CGI/DIPOA.

Atenciosamente,

RAFAEL OLIVEIRA FILIPPETTI  
FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO  
CARTEIRA FISCAL Nº3034  
COORDENADOR-GERAL  
CGI/DIPOA/SDA/MAPA



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Secretaria de Defesa Agropecuária  
Departamento de Saúde Animal

Mem Circular Nº 12/2015-DSA

Em, 13 de fevereiro de 2015

Aos Chefes de SSAs, SISAs, SIFISAs todos.  
C/c: Superintendentes Federais de Agricultura todos.

Assunto: Ocorrência de mortalidade em suínos.  
Referência: Memo Circ. 10/2015

Senhores Chefes,

- Retornamos a V.Sª, desta feita, para complementar as informações do Memo Circular nº 10/2015-DSA, de 9 de fevereiro de 2015, que trata da ocorrência de mortalidade em suínos.
- Desde novembro p.p., o Serviço Veterinário Oficial - SVO começou a ser notificado sobre o aumento da mortalidade de leitões neonatos e leões de cascos e focinho de matrizes. Até o momento, em todos os casos investigados pelo SVO, após avaliações clínicas e epidemiológicas, foram descartadas as doenças que compõem a síndrome hemorrágica (doença alvo: Peste Suína Clássica), a síndrome vesicular (doença alvo: Febre Afosa) e a Diarreia Epidêmica Suína - PED.
- Não obstante todos os esforços públicos e privados, ainda não se chegou a um diagnóstico definitivo sobre o que esteja acometendo os rebanhos, razão pela qual foi marcada reunião técnica para o próximo dia 20 de fevereiro, com especialistas provenientes de universidades, laboratórios e centros de referência para buscarmos um direcionamento que possa elucidar o que vem ocorrendo nesses propriedades, já que não se trata de enfermidade conhecida.
- Visando o real dimensionamento do que vem ocorrendo a campo, solicitamos que todos os casos notificados ao SVO relatando o aumento de mortalidade em leitões e a presença de lesões de cascos e focinho em suínos sejam prontamente atendidos e seguidos os procedimentos definidos pelos programas sanitários e no manual do SVO.
- O consolidado da informação deverá ser organizado no formato proposto abaixo, para encaminhamento semanal à DEP e respectivo programa sanitário.

UF	Número da ocorrência	Município	Motivo da investigação	Motivo para o descarte pelo SVO	Diagnóstico provável ou conclusivo	Observação

- Qualquer informação adicional que venha a surgir será imediatamente comunicada por este Departamento, não cabendo, neste momento, quaisquer medidas restritivas, já que o SVO dos estados envolvidos e o próprio MAPA continuam atendendo a todos os casos suspeitos e buscando aprofundamento das análises e ampliação da abordagem quando das investigações.
- Outrossim, solicitamos encaminhamento do presente aos Serviços Veterinários Estaduais e aos setores da cadeia produtiva para conhecimento.

Atenciosamente,

Méu. Vet. *Juliana H. Figueiredo Marques*  
Fiscal Federal Agropecuária  
Diretor do DSA

## 7.2 Classificação da Família *Picornaviridae*

### Classificação da Família *Picornaviridae*



## Virus Taxonomy: 2015 Release

EC 47, London, UK, July 2015;  
Email ratification 2016 (MSL #30)

### Ordem

<i>Picornavirales</i>	<b>Família</b> <i>Picornaviridae</i>	<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>
		<i>Aphthovirus</i>	<i>Bovine rhinitis A virus</i> <i>Bovine rhinitis B virus</i> <i>Equine rhinitis A virus</i> <i>Foot-and-mouth disease vírus*</i>
		<i>Aquamavirus</i>	<i>Aquamavirus A</i>
		<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avihepatovirus A</i>
		<i>Avisivirus</i>	<i>Avisivirus A</i>
		<i>Cardiovirus</i>	<i>Cardiovirus A</i> <i>Cardiovirus B</i> <i>Cardiovirus C</i>
		<i>Cosavirus</i>	<i>Cosavirus A</i>
		<i>Dicripivirus</i>	<i>Cadicivirus A</i>
		<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i> <i>Enterovirus B*</i> <i>Enterovirus C</i> <i>Enterovirus D</i> <i>Enterovirus E</i> <i>Enterovirus F</i> <i>Enterovirus G</i> <i>Enterovirus H</i> <i>Enterovirus J</i> <i>Rhinovirus A</i> <i>Rhinovirus B</i> <i>Rhinovirus C</i>
		<i>Erbovirus</i>	<i>Erbovirus A</i>
		<i>Gallivirus</i>	<i>Gallivirus A</i>
		<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatovirus A</i>

<i>Hunnivirus</i>	<i>Hunnivirus A</i>
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus A</i> <i>Aichivirus B</i> <i>Aichivirus C</i>
<i>Kunsagivirus</i>	<i>Kunsagivirus A</i>
<i>Limnipivirus</i>	<i>Limnipivirus A</i> <i>Limnipivirus A</i> <i>Limnipivirus C</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Melegrivirus A</i>
<i>Mischivirus</i>	<i>Mischivirus A</i>
<i>Mosavirus</i>	<i>Mosavirus A</i>
<i>Oscivirus</i>	<i>Oscivirus A</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus A</i> <i>Parechovirus B</i>
<i>Pasivirus</i>	<i>Pasivirus A</i>
<i>Passerivirus</i>	<i>Passerivirus A</i>
<i>Potamipivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>
<i>Rosavirus</i>	<i>Rosavirus A</i>
<i>Sakobuvirus</i>	<i>Sakobuvirus A</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Salivirus A</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Avian sapelovirus</i> <i>Sapelovirus A</i> <i>Sapelovirus B</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>
<i>Sicinivirus</i>	<i>Sicinivirus A</i>
<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus A</i>
<i>Tremovirus</i>	<i>Tremovirus A</i>

## 7.3 Lista de Reagentes

### Lista de Reagentes

1. Acetona, P.A. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) P.M. 58,08 (Dinâmica<sup>®</sup>)
2. Ácido acético glacial, P.A. ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) P.M. 60,05 (Nuclear<sup>®</sup>)
3. Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) P.M. 61,83 (Sicalab<sup>®</sup>)
4. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen<sup>®</sup>)
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen<sup>®</sup>)
6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ ) P.M. 372,24 (Reagen<sup>®</sup>)
7. Ácido fórmico P.A./ACS (Reatec<sup>®</sup>)
8. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL<sup>®</sup>)
9. Agar Noble (Difco<sup>®</sup>)
10. Agarose (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies)
11. Água DEPC (Diethyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
12. Álcool etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) P.M. 46,07 (Nuclear<sup>®</sup>)
13. Álcool isoamílico ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) P.M. 88,15 (Synth<sup>®</sup>)
14. Antibiótico-antimicótico (Gibco<sup>®</sup>)
15. Anticorpos (E-caderina e Ki-67) (Zymed<sup>®</sup>)
16. Azul de bromofenol (Sigma<sup>®</sup>)
17. Bicarbonato de sódio P.A. ( $\text{NaHCO}_3$ ) P.M. 84,01 (Biotec<sup>®</sup>)
18. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
19. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma<sup>®</sup>)
20. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma<sup>®</sup>)
21. Brometo de etídeo ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ ) P.M. 394,3 (Sigma<sup>®</sup>)
22. Cloreto de cálcio puro ( $\text{CaCl}_2$ ) P.M. 110,94 (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies)
23. Cloreto de magnésio 50 mM ( $\text{MgCl}_2$ ) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
24. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen<sup>®</sup>)
25. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen<sup>®</sup>)
26. Clorofórmio, P.A. ( $\text{CHCl}_3$ ) P.M. 119,38 (Dinâmica<sup>®</sup>)
27. DAB (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
28. Didhiothreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
29. Dimetil sulfóxido (DMSO)  $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$  (Sigma<sup>®</sup>)

30. Dióxido de sílica (SiO<sub>2</sub>) P.M. 60,08 (Sigma<sup>®</sup>)
31. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
32. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
33. 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<sup>™</sup>)
34. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) P.M. 288,38 (Synth<sup>®</sup>)
35. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL<sup>®</sup>)
36. Eosina (Nuclear<sup>®</sup>)
37. Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
38. Formaldeído P.A. (Vetec<sup>®</sup>)
39. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) P.M. 141,96 (Synth<sup>®</sup>)
40. Fosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) P.M 177,99 (Merck<sup>®</sup>)
41. Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2H<sub>2</sub>O) P.M. 155,99 (Reagen<sup>®</sup>)
42. Gelatina U.S.P. (Synth<sup>®</sup>)
43. Glicina, P.A. (Nuclear<sup>®</sup>)
44. Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) P.M. 180,16 (Reagen<sup>®</sup>)
45. Hematoxilina (Nuclear<sup>®</sup>)
46. Hidroquinona (Nuclear<sup>®</sup>)
47. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica<sup>®</sup>)
48. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab<sup>®</sup>)
49. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL<sup>®</sup>)
50. Metanol P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Allkimia<sup>®</sup>)
51. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/µL (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
52. Nitrato de Prata (Synth<sup>®</sup>)
53. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* SVV-2682FW (forward; 5'-TTCCACTCCACCGACAACG -3'; nucleotide (nt) 2682-2700) Leme et al. (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
54. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* SVV-3224RV (reverse; 5'-GATACCTTCCCACCCTTGC -3'; nucleotide (nt) 3206-3224) Leme et al. (2015) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
55. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)

56. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies™)
  57. 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™)
  58. PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen Life Technologies™)
  59. RT-Buffer (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
  60. Soro fetal bovino (Gibco BRL®)
  61. SuperPicture™ Polymer Detection kit (Invitrogen Life Technologies™)
  62. SuperScript III™ Reverse Transcriptase 200 U/μL (Invitrogen Life Technologies™)
  63. QuantIT™ dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies™)
  64. Sacarose, P.A. – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) P.M. 342,31 (Reagen®)
  65. TripLE™ Express Stable Trypsin-like Enzyme (Gibco®)
  66. Triton x-100 (Synth®)
  67. Tris (Nuclear®)
  68. Xileno P.A. (Nuclear®)
  69. Vermelho de fenol (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>S) P.M. 354,38 (Reagen®)
-

## 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: nt 2682-2700

Concentração: 41,1 nmoles

Data de fabricação: Fev / 2015

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

$$41100 / 200 = 205,5$$

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

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

- *Primer reverse SVV-3224RV*

Sequência: 5´- GATACCTTCCCACCCTTGC – 3´

Posição: nt 3206-3224

Concentração: 30,7 nmoles

Data de fabricação: Fev / 2015

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

$$30700 / 200 = 153,5$$

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

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

- **Diluição de dNTP**
  - Solução estoque (100 mM) – 100 µL de cada dNTP
  - Solução uso (10 mM) – 10 µL da solução estoque + 90 µL de água ultrapura autoclavada
  
- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
  - 25 mL fenol saturado
  - 24 mL clorofórmio
  - 1 mL álcool isoamílico
  
- **Gel de agarose 2%**
  - 1,0 g agarose
  - 50 mL de tampão TBE 1x
  - 20 µL de brometo de etídio
  
- **Hidratação da sílica**
  - 6 g de sílica (SIGMA<sup>®</sup>)
  - Adicionar 50 mL de água ultrapura autoclavada
  - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
  - Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
  - Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
  - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
  - Desprezar 44 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 (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)
  - 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 x-100

- **Solução L2**
  - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**
  - 0,25 g de azul de bromofenol 0,25%
  - 45 g de sacarose – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) 45%
  - água bidestilada q.s.p. 100 mL
- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**
  - 0,2 mL de azul de bromofenol 0,25%
  - 6 mL de SDS 10%
  - 1 mL de 2-mercaptoetanol
  - 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M
- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
  - 107,78 g de TRIS 0,89 M
  - 55,03 g de ácido bórico 0,89 M
  - 7,45 g de EDTA 0,02 M
  - água bidestilada q.s.p. 1 litro
  - ajustar o pH (pH 8,4)
- **Tampão de corrida para PAGE**
  - 3 g de TRIS 0,24 M
  - 14,4 g de ácido amino acético (glicina) NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH 0,19 M
  - água bidestilada q.s.p. 1 litro
- **Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/Ca<sup>++</sup>) 10 x – pH 7,2**
  - 12,12 g de TRIS 0,89 M
  - 2,2 g de cloreto de cálcio 1,5 mM
  - água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão Fosfato Salina – PBS**

- 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
- 3 mM Cloreto de potássio (KCl)
- 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 15 mM Fosfato de potássio monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL

- **Solução Salina Saint Groth**

- 8 g de Cloreto de sódio (NaCl)
  - 0,4 g Cloreto de potássio (KCl)
  - 1,77 g Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
  - 0,69 g Fosfato de potássio monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
  - 2 g Glicose
  - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1 L
  - pH 7,2
-

### Protocolos de Técnicas

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

1. *Suspensão fecal – extração bruta*

- 100  $\mu$ L ou 100 mg de fezes
- 500  $\mu$ L de PBS
- Vortexar
- Centrifugar a 5000 x g / 3 min
- Utilizar 400  $\mu$ L do sobrenadante para extração

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

- 1,5 g do fragmento de órgão (fígado ou pulmão)
- Macerar
- 15 mL PBS
- Vortexar
- Centrifugar a 3000 x g / 10 min
- Utilizar 250  $\mu$ L do sobrenadante para extração
  
- 250  $\mu$ L da suspensão do fragmento de órgão
- 10  $\mu$ L 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

### 3. Extração do ácido nucléico

#### Fase I – Fenol

- 400 µL da suspensão fecal OU 200 µL da suspensão de tecido
- Adicionar 40 µL de SDS 10% OU 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  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado
  - Homogeneizar em *vortex*
  - Centrifugar 10.000 x *g* /30 s
  - Desprezar sobrenadante em descarte comum
  - Adicionar 1000  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$
  - Estocar à -20 °C até a utilização
- **Transcrição reversa (RT)**
    - Mix de Desnaturação e RT para detecção parcial da região da VP3/VP1 do genoma do *Senecavirus A*

<b>Desnaturação (65 °C / 5 min)</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<i>Primer</i> SVV-3224RV (20 pmol)	2
dNTP (2,5 mM)	1
Água ultrapura	6
RNA	5
Volume final	14

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

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

- Mix de PCR para detecção parcial da região da VP3/VP1 do genoma do *Senecavirus A*

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

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR

<b>Reação</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Nº de Ciclos</b>
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%**

- 1,0 g de agarose

- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; 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 por 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 3 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.

3. Incubar o tubo a 50 °C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.

4. Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com coluna.

5. Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.

6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.

7. Adicionar 500 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.

8. Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.

9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.

10. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.

11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.

12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.

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.

- **Purificação direta de produto de PCR**

1. Adicionar 4 volumes do *Binding buffer* (B2) a 1 volume de reação de PCR.
2. Transferir a solução para uma coluna de purificação.
3. Centrifugar a 13.000 x *g* / 1 min.
4. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
5. Adicionar 650 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
6. Centrifugar a 13.000 x *g* / 1 min.
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
11. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
12. Centrifugar a 13.000 x *g* / 1 min.
13. 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

- **Sequenciamento pelo método Sanger**

- Preparo de amostras para o sequenciamento

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

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

- Mix do sequenciamento

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

\* *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

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

- Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento\*

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

\* Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

- Precipitação com EDTA e Etanol

- Adicionar os 10 µL da reação de sequenciamento em um poço de uma placa *MicroAmp*<sup>®</sup> *Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (*Applied Biosystems*).
- Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.
- Adicionar 30 µL de etanol 100%.
- Homogeneizar lentamente a placa.
- Incubar a placa por 10 minutos em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2720 x g durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar 10 µL de formamida (HIDI).
- Adicionar a septa.
- Homogeneizar a placa em vórtex.
- Submeter à placa a um spin no *miniplate spinner*.
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

• **Isolamento do *Senecavirus A***

1. Células

- Preparar células PK-15 em garrafas (25 mL) 24 h antes da inoculação do material (inóculo).
- 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 de DMEM (sem SFB) + 50 µL de Anti-Anti 100X (antibiótico e antifúngico - Gibco®)
- Utilizar 1 mL para inoculação

#### *Suspensão de tecido*

- 1,5 g do fragmento de órgão
- 1 mL 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 1 mL do sobrenadante para inoculação.

### 3. Adsorção

- 1 mL do material previamente preparado (líquido de vesícula ou tecido).
- Remover o meio das garrafas com células.
- Lavar garrafa 3X com solução salina de Saint Groth.
- Adicionar 1 mL do inóculo em garrafa contendo monocamada de cultivo de célula PK-15 mantida sob condição estacionária.
- Incubar em agitação em estufa a 37°C/3 h a 5% de CO<sub>2</sub> controlado
- 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<sub>2</sub> e monitorar diariamente para a presença de efeito citopático (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 por 24 h.

- **Imunohistoquímica**

- Xilol I – 20 min.
- Xilol II – 20 min.
- Álcool absoluto I – 10 min.
- Álcool absolute II – 10 min.
- Álcool 90% – 5 min.
- Álcool 80% – 5 min.
- Álcool 70% – 5 min.
- Lavar em água corrente por 10 min.
- Enxaguar duas vezes em água destilada.
- Recuperação Antigênica.
- Para SVV-60: Colocar as lâminas em recipiente plástico com solução tampão citrato pH 6,0 em micro-ondas (750W) por 9 min. Deixar esfriar em temperatura controlada (25°C), na solução tampão citrato pH 6,0 por 30 min.
- Lavar em água corrente por 10 min.
- Enxaguar duas vezes em água destilada.
- Colocar as lâminas em solução de metanol (140 mL) + água oxigenada 20 volumes (10 mL).
- Deixar em cuba de vidro em câmara escura por 20 min.
- Lavar em água corrente por 10 min.
- Enxaguar duas vezes em água destilada.
- Secar as lâminas individualmente com papel absorvente e colocar o anticorpo primário (SVV-60) cobrindo todo o corte.
- Incubar em câmara úmida, deixando em geladeira por 18 h.
- Lavar as lâminas com solução PBS pH 7,2 por 5 min (repetir duas vezes).
- Secar as lâminas individualmente e colocar uma gota do anticorpo secundário, cobrindo todo o corte. Incubar a 25°C por 20 min.
- Lavar as lâminas com solução de PBS pH 7,2 por 5 min (repetir duas vezes).
- Cobrir o corte com o DAB e observar revelação (3 a 4 min).
- Lavar as lâminas em água corrente por 10 min.
- Enxaguar duas vezes com água destilada.
- Contra-corar com hematoxilina (3 min).
- Lavar em água corrente por 10 min.

- Enxaguar em água destilada duas vezes.
- Álcool 70% – 5 min.
- Álcool 80% – 5 min.
- Álcool 90% – 5 min.
- Álcool absoluto I – 10 min.
- Álcool absoluto II – 10 min.
- Xilol I – 20 min.
- Xilol II – 20 min.
- Montar as lâminas.

- **Hematoxilina-eosina (HE)**

- Xilol I – 20 min.
  - Xilol II – 20 min.
  - Álcool absoluto I – 2 min.
  - Álcool absoluto II – 2 min.
  - Álcool 95% I – 2 min.
  - Álcool 95% II – 2 min.
  - lavar em água destilada – 2 min.
  - Corar com hematoxilina (10 min).
  - Lavar em água corrente por 10 min, desprezar a primeira água em recipiente apropriado.
  - Álcool 95% – 1 min.
  - Eosina – 1 min.
  - Álcool 95% - 1 min.
  - Álcool absoluto I – 2 min.
  - Álcool absoluto II – 2 min.
  - Xilol I – 2 min.
  - Xilol II – 2 min.
  - Montar as lâminas.
-

## 7.6 Lista de *Softwares*

---

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3

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

- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool

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

- MEGA package software version 6

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

- BioEdit software version 7.1.11

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

**“Aprendamos a entesourar os dons da vida, respeitando os ensinamentos que o mundo nos impõe, na certeza de que, entre a humildade e o trabalho, alcançaremos, um dia, os cimos da glória eterna.”**

**Por minha avó, Odette (*in memoriam*)**

**(autor desconhecido).**