

Júnio César Santos

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE INFECÇÃO DE *SENECAVIRUS A* EM GRANJAS
COMERCIAIS DE SUÍNOS PÓS OCORRÊNCIA DA DOENÇA CLÍNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Abelardo Silva Junior

Coorientador: Carlos Eduardo Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S237i
2023 Santos, Júnio César, 1991-
Identificação e perfil de infecção de *Senecavirus* A em
granjas comerciais de suínos pós ocorrência da doença clínica /
Júnio César Santos. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (46 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Abelardo Silva Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Referências bibliográficas: f. 40-46.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.764>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Suínos - Doenças. 2. *Senecavirus*. 3. Vesícula biliar -
Doenças. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Soroterapia.
6. Vírus - Isolamento. I. Silva Júnior, Abelardo, 1977-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.4089691


JÚNIO CÉSAR SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE INFECÇÃO DE *SENECAVIRUS A* EM GRANJAS
COMERCIAIS DE SUÍNOS PÓS OCORRÊNCIA DA DOENÇA CLÍNICA**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de junho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **JUNIO CESAR SANTOS**
Data: 18/12/2023 23:39:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Júnio César Santos
Autor

Documento assinado digitalmente
 **ABELARDO SILVA JUNIOR**
Data: 19/12/2023 20:18:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Abelardo Silva Junior
Orientador

À minha mãe, irmãs e família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu sustento, por me surpreender a cada dia com sua infinita misericórdia, e por colocar o chão aos meus pés, onde eu possa caminhar sem medos atrás dos meus sonhos.

À minha mãe Cida, por ser a grande apoiadora dos meus sonhos, lutando por eles comigo, sem medir esforços.

A toda minha família, em especial às minhas irmãs Vanessa e Carol, meus sobrinhos Miguel e Laura, minha tia Janaina, e meus primos Kauan e Rafael. Todos estes que, bem de perto acompanharam e apoiaram minhas lutas e causas. Os agradecimentos também se estendem aos demais familiares por toda torcida para que eu alcançasse meus objetivos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Aos professores por todo apoio e conhecimento oferecidos. Em especial agradeço aos professores Abelardo, Fernanda e Ricardo, que me ensinaram e acompanharam no decorrer do mestrado; aos técnicos, principalmente ao Marquinho e Nívia, que sempre foram muito solícitos para comigo, e também a Rosi, que, em sua proatividade e empatia sempre se empenhou para a resolução dos trâmites necessários no decorrer da pós-graduação.

A prof. Dra Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais que nos cedeu a amostra de vírus controle para os ensaios de soroneutralização. Ao prof. Dr João Alberto Farinelli Pantaleão da Universidade Federal de Alagoas e Prof. Dr. David Germano Gonçalves Schwarz pelos auxílios nas análises genéticas e estatísticas, respectivamente.

Aos meus colegas de laboratório, das disciplinas cursadas e aos demais que me auxiliaram no campo, por toda ajuda, companheirismo e troca de conhecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

“O bom Deus não poderia inspirar em mim sonhos irrealizáveis”.

(Santa Teresinha)

RESUMO

SANTOS, Júnio César, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Identificação e perfil de infecção de *Senecavirus A* em granjas comerciais pós ocorrência da doença clínica.** Orientador: Abelardo Silva Junior. Coorientador: Carlos Eduardo Real Pereira.

A suinocultura é uma atividade de notória importância para a economia mundial. O Brasil, quarto maior produtor de carne suína, possui muitas propriedades suinícolas, e de acordo com a expansão do setor, crescem também as preocupações e medidas preventivas a respeito de doenças emergentes. Destas, merecem destaque as doenças vesiculares, e dentre elas, a infecção pelo *Senecavirus A*, constatado no Brasil em surtos entre os anos de 2014 e 2015, apresentando episódios clínicos com vesículas em suínos, além de diarreia em leitões, com mortalidade e morbidade consideráveis. Diante do desafio, esta pesquisa apurou a presença do *Senecavirus A* (SVA) e respostas imunológicas dos animais frente à infecção natural causada pelo agente, em 5 propriedades suinícolas já desafiadas anteriormente, mas sem manifestação clínica da doença no momento da coleta, na microrregião de Ponte Nova, Minas Gerais. Foram coletadas 100 amostras em cada propriedade, totalizando 500, e a partir destas, foram realizadas técnicas de PCR em tempo real através de fezes e ensaios sorológicos por meio de soroneutralização. Foi possível verificar a circulação viral em duas propriedades da região estudada, através da PCR em Tempo Real. Nas demais granjas, observaram-se positividade sorológica em 4, com diferentes títulos de anticorpos, exceto uma que revelou resultados negativos nas duas técnicas executadas no experimento, o que pode inferir em um bom controle sanitário da propriedade. Com esses resultados foi possível destacar pontos importantes de controle de rotas de entradas do vírus, bem como caracterizar o perfil sorológico das granjas, o que pode auxiliar na elaboração de possíveis protocolos vacinais e demais medidas preventivas. Ademais, o estudo se faz de grande relevância para que também outros mais possam ser confeccionados, e também é de serventia como auxílio aos pesquisadores envolvidos ao *Senecavirus A*, em prol da suinocultura e do engrandecimento da ciência.

Palavras-chave: *Senecavirus*; Doenças vesiculares; PCR; Soroneutralização; Isolamento viral.

ABSTRACT

SANTOS, Júnio César, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. Identification and profile of *Senecavirus A* infection in commercial farms after the occurrence of clinical disease. Adviser: Abelardo Silva Júnior. Co-adviser: Carlos Eduardo Real Pereira.

Pig farming is an activity of notorious importance for the world economy. Brazil is the fourth largest producer of pork meat and has many pork farms and in line with the expansion of the sector, concerns and preventive measures regarding emerging diseases. In addition, vesicular diseases deserve to be highlighted, and among them, there is infection with *Senecavirus A*, found in Brazil in outbreaks between 2014 and 2015, presenting clinical episodes with vesicles in pigs and diarrhea in piglets. In this scenario, this research investigated the presence of *Senecavirus A* (SVA) and the animals' immune responses to the natural infection caused by SVA. Five farms were previously challenged with SVA but without clinical manifestation of the disease at the time of collection from the Ponte Nova microregion, Minas Gerais. One hundred samples were collected in each farm, totaling 500. PCR real-time technique were performed through feces and serological assays through serum neutralization. Through Real-Time PCR, it was possible to verify viral circulation in two farms in the studied region. In the other farms, serological positivity was observed in four farms, with different antibody titers, except one that revealed negative results. Considering these results, it was possible to highlight important points of control of virus entry routes and characterize the serological profile of the farms, which can help in elaborating possible vaccine protocols and other preventive measures. In addition, the study is of great relevance so that other studies can be carried out, and it is also useful as an aid to researchers involved in *Senecavirus A*, in favor of pig farming and the advancement of science.

Keywords: *Senecavirus*; Vesicular diseases; PCR; Serum neutralization; Viral isolation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Demonstrativo da imagem de microscopia eletrônica de transmissão do Senecavirus, representado em “a”. Esquema do vírus em “b” e “c”, demonstrando face externa e o vírus seccionado, respectivamente. Em “d” é possível ver o esquema do genoma do SVA, com as proteínas do capsídeo viral. Em “e” se observam os locais de clivagem representados pelas pontas das setas, na poliproteína do SVA	15
Figura 2– Árvore filogenética baseada no método de máxima verossimilhança construída com o modelo Kimura de dois parâmetros baseado na sequência nt parcial da região genômica VP1 das cepas de Senecavirus A obtidas neste estudo (sequências em negrito) e outras disponíveis no GenBank. Os números de acesso do GenBank são dados entre parênteses. Os números nas ramificações referem-se a valores de significância de 1.000 réplicas de bootstrap. Valores $\leq 50\%$ não são mostrados.....	28
Figura 3 – Média dos soropositivos de cada fase de criação, representando todas as granjas analisadas no experimento	29
Figura 4A – Média total dos Log4 dos títulos de anticorpos de cada fase de criação, de todas as granjas analisadas	30
Figura 4B – Média total de cada fase de criação dos animais positivos por meio da técnica de PCR em tempo real	30
Figura 5A – Número total absoluto de soropositivos na granja 1, considerando suas respectivas fases de produção	31
Figura 5B – Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 1 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade	31
Figura 6A – Número total absoluto de soropositivos na granja 3, considerando suas respectivas fases de produção	32
Figura 6B – Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 3 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade	32
Figura 7A – Número total absoluto de soropositivos na granja 4, considerando suas respectivas fases de produção	33

Figura 7B – Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 4 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade	33
Figura 8A – Número total absoluto de soropositivos na granja 5, considerando suas respectivas fases de produção	34
Figura 8B – Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 5 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade Avaliação de relação de significância entre as categorias de suínos com soropositividade absoluta	34
Figura 9 – Avaliação de relação de significância entre as fases de criação de suínos soropositivos, em análise qualitativa, onde verde mostra diferença estatística entre as fases, e em vermelho onde tal diferença não ocorre.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SVA	Senecavirus A
RNA	Ácido Robonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
LFDA	Laboratorio Federal de Defesa Agropecuária
OMS	Organização Mundial de Saúde
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
PBS	Tampão fosfato salino
TCID	Tissue culture infective dose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Senecavirus A (SVA) é um picornavírus de RNA fita simples, causador de doença vesicular em suínos de diferentes idades (MAGGIOLI et al., 2019a). O vírus foi identificado de forma acidental, como contaminante de cultura celular Per C6 (Células imortalizadas de retina humana) em 2002 nos Estados Unidos. No Brasil, foi detectado em surtos entre os anos de 2014 e 2015, através de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras de animais acometidos por vesículas (LEME et al., 2015a).

A presença do vírus também foi detectada em países de importância na produção suinícola, como Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, Tailândia e Vietnã (GUO et al., 2020). Ainda há poucas informações acerca de sua circulação no mundo, dinâmica de infecção, características genéticas e medidas preventivas. Os sinais clínicos são idênticos aos de outras doenças vesiculares de importância sanitária, como a febre aftosa, estomatite vesicular, exantema vesicular dos suínos e doença vesicular dos suínos. Tais sinais são compreendidos por lesões vesiculares e ulcerações em cavidade oral, focinhos e bandas coronárias (LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2017), e embora não comum, há relatos de mortalidade neonatal, perda de peso, síndrome de refugagem e diarreia, culminando em perdas econômicas e entraves sanitários aos produtores e abatedouros (CANNING et al., 2016).

Atualmente, o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG) em Pedro Leopoldo, MG, é o laboratório oficial credenciado para o diagnóstico de doenças vesiculares dos suínos do Ministério da Agricultura e Pecuária (RODRIGUES, 2006). Na suspeita de doença vesicular, a propriedade é interditada e a Defesa Sanitária Animal é comunicada, e todo o fluxo de animais da propriedade fica suspenso até que se obtenham os resultados oficiais dos exames necessários (MAPA, 2007).

Pesquisas de identificação e sorologia das propriedades são muito importantes para o monitoramento e status sanitário dos rebanhos. Este estudo contribuirá para que se estabeleça a caracterização viral, através de técnicas de PCR em tempo real, além de sorologia de SVA, por meio de soroneutralização, e a caracterização da circulação viral permitirá estratégias de elaboração de um protocolo de vacinação. Espera-se que os resultados encontrados neste estudo possam contribuir para os

desafios de campo causados pelo SVA, bem como para a elaboração de testes diagnósticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais e econômicos da suinocultura

A suinocultura é um setor agropecuário de grande importância, sendo a carne suína um produto amplamente consumido em nível mundial. Trata-se de uma atividade rentável, que tornou o Brasil o quarto maior produtor de produtos cárneos suínos. Diante de tal fato, percebe-se que há uma grande demanda e perspectiva para com o setor em questão (MARTINS; TRIENEKENS; OMTA, 2017). Entre os maiores produtores mundiais em suinocultura, se destacam a China, União Europeia e Estados Unidos (NÄÄS, 2002).

No Brasil, há um vasto número de propriedades suinícolas, em diversas regiões, concentrando-se nos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (SOUZA, 2017), e de acordo com a expansão da criação de suínos, crescem de forma proporcional, as fiscalizações e medidas preventivas de doenças regionais e emergentes (SU, 2019).

Dentre as enfermidades que preocupam a suinocultura, merecem destaque as doenças vesiculares, que exigem notificação compulsória, uma vez que a Febre Aftosa pode ser uma doença suspeita. Por terem sinais clínicos semelhantes, são principais diagnósticos diferenciais a estomatite vesicular, exantema vesicular dos suínos, doença vesicular dos suínos e senecavírus, sendo então necessários exames laboratoriais comprobatórios (PEZZONI et al., 2020). É válido ressaltar que, o vírus do Exantema Vesicular dos Suínos foi considerado erradicado e que a Doença Vesicular dos Suínos nunca foi detectada no Brasil (RIET-CORREA et al., 1996).

2.2. Febre Aftosa e importância das doenças vesiculares

A febre aftosa é uma doença causada por um Picornavirus, que afeta animais de cascos fendidos e por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS), é a enfermidade mais preocupante relacionada a doenças vesiculares. Trata-se de uma doença altamente contagiosa e requer notificação compulsória. A apresentação clínica da doença persiste em vesículas localizadas principalmente em focinho,

cavidade oral e bandas coronárias, acompanhadas de febre e incômodos aos animais doentes, considerando as regiões acometidas pelas vesículas (PATON; GUBBINS; KING, 2018).

O Brasil é considerado livre da febre aftosa com vacinação, com exceção dos Estados de Santa Catarina, Acre, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia e regiões dos Estados do Amazonas e do Mato Grosso, que são considerados livres da doença sem o agente imunizante (MAPA, 2020). O controle da enfermidade se dá principalmente por medidas de biossegurança em toda cadeia produtiva animal e com vacinação em áreas e animais em que tal conduta é necessária (MARQUES et al., 2016). As demais doenças são também de muita importância para a produção animal, embora não seja da mesma magnitude da febre aftosa. Os problemas relacionados ao bem estar animal e entraves econômicos podem variar de acordo com a intensidade das manifestações clínicas de cada animal, bem como os locais de acometimento das lesões (PEZZONI et al., 2020).

2.3. Família *Picornaviridae*

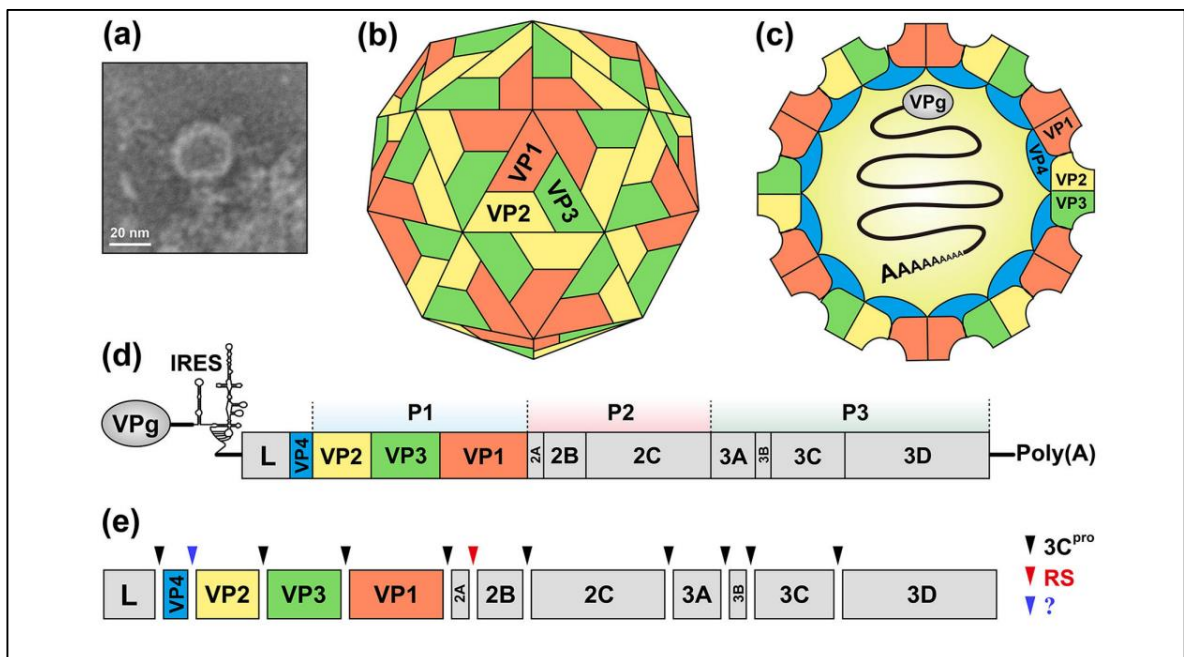
Picornaviridae é compreendida por uma família de vírus pequenos, não envelopados, sendo representados por mais de 30 gêneros e mais de 75 espécies (ZELL et al., 2017). Exemplos memoráveis são os *Aphthovirus* (ALEXANDERSEN et al., 2003) e *Senecavirus*, que por sua vez trazem grandes transtornos para a produção suinícola, acarretando em prejuízos econômicos e preocupações de caráter sanitário (ZANELLA; MORÉS; DE BARCELLOS, 2016). Na infecção da célula hospedeira por vírus pertencentes a esta família, há processos de adsorção e penetração do vírus, por meio de interações de receptores celulares e proteínas do capsídeo viral. Estas se ligam aos receptores celulares do hospedeiro, e tem seu o capsídeo liberado no citoplasma, com a liberação do material genético, e ali então, acontece replicação viral do agente (ROSSMANN; HE; KUHN, 2002).

2.4. *Senecavirus* e seus aspectos gerais

Senecavirus, denominado pelo comitê internacional de taxonomia viral em 2019, é um vírus oncolítico, de caráter emergente, não envelopado, e assim como o vírus da Febre Aftosa, é pertencente à família *Picornaviridae*. (ICTV, 2019). Tal vírus foi

descoberto a partir de contaminantes de células Per C6 (Células imortalizadas de retina humana) em 2002. Trata-se de um vírus pequeno, de RNA fita simples, com polaridade positiva, genoma de 7,2kb. Seu capsídeo viral é constituído pelas proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, e pelas proteínas não estruturais: L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D (ZHANG et al., 2019). Em relação à infectividade do SVA, um estudo sugeriu fortemente a interação direta e específica da proteína transmembrana ANTXR1 com o SVA, descrevendo-a como necessária para infecção do patógeno em diversas linhas celulares. Foi descrito que o SVA é único entre as espécies virais conhecidas em usar a proteína transmembrana ANTXR1 como um receptor primário. Dados apresentados no trabalho identificam esta proteína como um receptor essencial à permissividade do SVA, inclusive em algumas linhagens de células cancerígenas (MILES et al., 2017).

Figura 1: Demonstrativo da imagem de microscopia eletrônica de transmissão do Senecavirus, representado em “a”. Esquema do vírus em “b” e “c”, demonstrando face externa e o vírus seccionado, respectivamente. Em “d” é possível ver o esquema do genoma do SVA, com as proteínas do capsídeo viral. Em “e” se observam os locais de clivagem representados pelas pontas das setas, na poliproteína do SVA. (LIU et al., 2020)



2.5. *Senecavirus A* no Brasil

No Brasil, a presença do SVA foi constatada entre os anos de 2014 e 2015, em surtos em propriedades produtoras de suínos, em alguns estados brasileiros, através de técnicas de PCR, a partir de amostras obtidas em líquidos vesiculares de animais acometidos por tais lesões (LEME et al., 2015b). No ano de 2018, um novo surto da doença ocorreu nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LEME et al., 2019). Além do Brasil, países importantes produtores de suínos como Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, Tailândia e Vietnã também relataram a descoberta do vírus em seus respectivos territórios (ZHANG et al., 2021). Um estudo retrospectivo avaliou uma série de amostras de soros de suínos coletados entre os anos de 2007 a 2016 nos principais estados produtores suinícolas do território brasileiro, através de técnicas de soroneutralização, e seus resultados determinaram que antes do ano de 2014, ainda não havia a presença do SVA no país (SAPORITI et al., 2017).

2.6. Ocorrência e sinais clínicos

O SVA é a única espécie representante do gênero, sendo também descrito como SVA 1. Trata-se de um vírus também associado a doenças vesiculares em suínos, de característica aguda, autolimitante e transiente. Antes de sua descoberta, muitos relatos foram considerados como doença vesicular idiopática dos suínos (GUO et al., 2016). Atualmente há mais facilidades em detectar infecções por *Senecavirus A* por meio de exames laboratoriais. Os sinais clínicos, assim como nas demais doenças vesiculares já conhecidas, consistem principalmente em lesões vesiculares, localizadas em região de focinho, cavidade oral, patas e banda coronária (JOSHI et al., 2016a). Há relatos isolados sobre a ocorrência de diarreia em leitões em maternidade, ocorrência de lesões vesiculares em matrizes e incidência de mortalidade neonatal, associados a tal infecção viral, em fazendas dos Estados Unidos (CANNING et al., 2016). A doença está fortemente relacionada ao estresse e a queda de imunidade dos animais, onde tal ocasião favorece a infecção do vírus no organismo (MAGGIOLI et al., 2019b). Há também a manifestação subclínica da

doença, o que contribui para a perpetuação do vírus nas instalações suinícolas, o que é um fato preocupante e que persiste em análise (HOUSTON; TEMEEYASEN; PIÑEYRO, 2020).

2.7. Variabilidade genética

Embora seja a mesma espécie, há uma variedade genética do vírus ao se comparar sua linhagem histórica e contemporânea. Diferenças genéticas entre linhagens foram encontradas no Brasil e outros países. É importante salientar que os vírus históricos relatados não apresentaram patogenicidade ao hospedeiro. Uma análise filogenética entre os vírus históricos e contemporâneos, entre 1988 e 2017 foi realizada, evidenciando que a maioria das cepas de SVA formavam clados filogenéticos com base em sua origem geográfica. Essas observações indicaram relações filogenéticas, sugerindo transferências genômicas de cepas entre regiões distintas no mundo. Embora a real origem do surto de SVA seja desconhecida, a relação filogenética entre as sequências incluídas no estudo apresentado é sugestiva de que a cepa histórica SVA pode ser o ancestral das cepas contemporâneas que atualmente circulam na população suína sugerindo fortemente o processo evolutivo do viral (JOSHI et al., 2020).

2.8. Ensaio experimental

Em inoculações virais experimentais, observaram viremia decrescente entre o terceiro e décimo dia, e excreção viral até os 28 dias após infecção, pelas vias oral, fecal e nasal. No estudo, em 38 dias após a infecção, notaram-se a presença do vírus nas amígdalas, no epitélio das criptas intestinais, nos linfócitos e folículos linfoides (JOSHI et al., 2016). Picos de infecção da doença já foram descritos aos 14 dias de infecção, com produção de IgM e anticorpos neutralizantes, estes quais se mantiveram com a diminuição da viremia. Na resposta celular à infecção, predominaram-se linfócitos TCD4 e TCD8, respectivamente (MAGGIOLI et al., 2017).

2.9. Desafios

Entraves relacionados ao controle do SVA podem ser encontrados de diversas maneiras. A presença desse patógeno fora também descrita em fezes de camundongos, em bovinos, moscas de propriedades, bem como nos ambientes e instalações das mesmas, o que pode favorecer a transmissão e disseminação do vírus, dificultando sua erradicação (JOSHI et al., 2016).

Ademais, a ocorrência subclínica da doença é um fator relevante e desafiador, uma vez que a não manifestação da doença pode culminar na perpetuação do agente etiológico, com conseqüente evolução e resistência no ambiente e nos animais acometidos (HOUSTON; TEMEEYASEN; PIÑEYRO, 2020).

2.10. Diagnóstico e controle

Quanto ao isolamento do vírus, há autores que relatam este método em células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H1299) (PINHEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2019), células de rim suíno (PK-15) (GUO et al., 2020), células de rim de hamster (BHK-21) (SEGALÉS et al., 2017), sendo esta primeira linhagem celular descrita, a que obteve melhor resultado, o que condiz com o fato de o SVA ser um vírus com tropismo oncolítico.

O diagnóstico da doença pode ser realizado através de técnicas moleculares como a PCR, em todas as suas modalidades (BRACHT et al., 2016), como também por isolamento viral (QIAN et al., 2016), soroneutralização (GOOLIA et al., 2017), ou também através de exames histopatológicos (OLIVEIRA et al., 2017). Na técnica de PCR em tempo real, têm se mostrado resultados satisfatórios, utilizando intercalantes de ácidos nucleicos de fita dupla (MU et al., 2020) ou sonda TaqMan (DALL AGNOL et al., 2017).

Por se tratar de uma doença viral de suínos, não há um tratamento específico a fim de que se resolva a problemática. Medidas paliativas de suporte podem ser empregadas, podendo ser de diferentes formas, que variam de acordo com a apresentação clínica dos animais acometidos (ZANELLA; MORÉS; DE BARCELLOS, 2016).

Atualmente, há vacinas comerciais e experimentais utilizadas na prevenção da doença (BUCKLEY; LAGER, 2022), porém, as demais medidas de biossegurança

são indispensáveis fatores capazes de prevenir tal problema. São ações preconizadas, além da delimitação da área da unidade produtora com cercas adequadas às granjas, higienização das instalações rotineiramente, controle de entrada e saída de veículos nas propriedades, controle de roedores e insetos, aquisição de animais de procedência, quando pertinente (SANTOS et al., 2008), e isolamento de animais suspeitos imediatamente, além de notificação imediata ao Serviço Veterinário Oficial, conforme a legislação vigente, quando houver acometimento por lesões vesiculares (BRASIL; MAPA, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar a identificação e a distribuição de anticorpos de *Senecavirus A* em granjas de suínos que já sofreram desafio natural nos anos de 2015 e 2016, mas que já não apresentava doença clínica no momento da coleta, na microrregião de Ponte Nova, no estado de Minas Gerais.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar a soroprevalência de *Senecavirus A* nas granjas amostradas;
- Determinar o soroperfil da distribuição das frequências e títulos de anticorpos contra o SVA dos animais amostrados;
- Detectar a presença do RNA de *Senecavirus A* na microrregião de Ponte nova, em Minas Gerais e adjacências, por meio da técnica de PCR em tempo real;
- Realizar a caracterização genética viral nas granjas positivas para o RNA viral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), por meio do processo de número 66/2021 (Anexo 1). As Normas de Conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV foram seguidas rigorosamente, sob a coordenação do Médico Veterinário Júnio César Santos CRMV-MG 16601.

4.2. Coleta das amostras e histórico das granjas

Foram coletadas entre março e julho de 2022, amostras de sangue e de fezes de 500 suínos, sendo distribuídas entre cinco granjas sem ocorrência de doença clínica após o ano de 2016, nas cidades de Urucânia, Teixeiras, Rio Casca, Jequeri e Ponte Nova, respectivamente, onde ocorreram os episódios de doenças vesiculares, entre os anos de 2014 e 2015, culminando em interdição até a visita do Serviço Veterinário Oficial e consequente diagnóstico clínico. Em cada uma destas propriedades, foram coletadas amostras de 100 animais, subdivididas entre 20 animais de cada grupo, sendo: matrizes (Maiores que 12 meses de idade), leitões de maternidade (0 a 21 dias), leitões de creche (22 a 60 dias), animais de crescimento (61 a 90 dias) e de terminação (91 a 130 dias). Tal número foi determinado por meio da plataforma online “EpilInfo”, com um intervalo de confiança de 95%. A tabela 1 ilustra a distribuição amostral do experimento.

Foram coletados 10mL de amostras de sangue total, proveniente das veias jugulares dos animais, para posterior obtenção de soro. As amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e armazenadas em caixa térmica com gelo, até seu envio ao laboratório. Posteriormente, foram centrifugadas a $1107 \times g$ por 10 minutos, e os sobrenadantes devidamente coletados em microtubos e armazenados sob refrigeração de -20°C , até o momento de serem analisados.

Foram também coletados aproximadamente 20g de fezes das ampolas retais dos suínos. Estas amostras foram depositadas em frascos estéreis, com posterior acondicionamento em caixa térmica com gelo, até o envio ao laboratório, onde foram

armazenadas em ultrafreezer com temperatura controlada a -80°C , até o momento de serem manipuladas.

4.3. Vírus

A cepa de *Senecavirus A* (SVALPVA 4) foi cedida em sua quinta passagem pelo Laboratório de Virologia, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais, e armazenada em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Imunobiológicos e Virologia Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, até o momento de sua utilização.

4.4. Células

Células da linhagem NCI-H1299 (Carcinoma de pulmão humano) foram cedidas pelo Departamento de Virologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Após a aquisição, elas foram cultivadas em Meio RPMI-1640 modificado contendo L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sódio 1 mM, 4500 mg/L de glicose e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal de bovino a 37°C , em estufa umidificada, com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, de acordo com as orientações do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.5. Soroneutralização

Para o teste de soroneutralização, foi utilizada a metodologia adaptada de HOUSE & BAKER, 1971. O procedimento foi realizado em microplacas de 96 cavidades TPP® de forma invertida, diferente da maneira tradicional, com a finalidade de haver mais diluições para os soros testes. Nesta placa, a primeira coluna foi constituída pelo controle de citotoxicidade do soro. Esta recebeu suspensão celular e soro não diluído. A diluição do soro suspeito foi realizada entre as colunas 2 a 12 da microplaca na base 2 de forma crescente do soro (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096). As amostras que tiveram título acima de 4096 foram submetidas a maiores diluições até 1:32768, com o auxílio de microplacas complementares. Desse modo, cada amostra de soro foi equivalente a cada uma das linhas das placas, e cada diluição do soro ocupou um poço de cada coluna da microplaca em ordem decrescente de concentração. Após as diluições, cada cavidade recebeu uma dose de vírus contendo 100TCID₅₀/50µl da cepa de *Senecavirus*, exceto a coluna 1. Após incubação da mistura de soro e vírus por 1 hora a 37°C em estufa a

5% de CO₂, uma suspensão de 50µl contendo 3x10⁴ Células NCI-H1299 fora adicionada, seguida de incubação em estufa de CO₂ a 37°C. A leitura dos testes realizou-se após 72 horas de incubação através do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados títulos de anticorpos neutralizantes as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, a ocorrência de efeito citopático. Amostras de referência positiva e negativa foram utilizadas como controle, juntamente com o controle de células e prova de titulação viral.

4.6. Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído das fezes. Estas foram ressuspensas e dissolvidas em uma alíquota de 400uL de PBS e posteriormente submetidas a centrifugação. A partir do sobrenadante proveniente deste procedimento, houve a continuidade com o processo de extração de RNA, utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin), conforme as recomendações do fabricante. O produto de extração foi obtido e armazenado em ultrafreezer a -80°C, até o momento de sua utilização.

4.7. Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Este foi sintetizado a partir do RNA extraído, conforme o item 3.5. Foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.8. PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real ocorreu a partir do material genético extraído das fezes coletadas e submetido à transcriptase reversa. Foi utilizada a metodologia adaptada de (MU et al., 2020). Os oligonucleotídeos utilizados na reação foram: SVAFP1 (5'-TGAAGTTGCGGAGAAGAT-3') (localização: 878-896) e SVARP1 (5'-TTGCGTAGTAATTGAAGGT-3') (localização: 966-985), que possibilitou a ampliação de regiões altamente conservadas do gene L/VP4 (codificante da proteína do capsídeo viral) nas amostras positivas. Os ensaios de qRT-PCR foram baseados em intercalantes de ácidos nucleicos de fita dupla, utilizando o GoTaq® qPCR Master Mix Promega. A amplificação e análise de curva de *Melting* foram realizadas utilizando o

sistema de detecção de PCR em tempo real Rotor-Gene 5- Plex HRM (QUIAGEN), Software Version: 2.3.1 (Build 49), Machine Serial No 0918158.

4.9. Nested-PCR

A PCR convencional foi realizada com o RNA de cinco amostras sabidamente positivas por meio da PCR em tempo real, com o intuito de obter um *amplicon* útil para a realização da reação de Nested PCR, que conseqüentemente proporcionou a obtenção de maior número de cópias no produto da reação. Para tal, foi utilizada a metodologia de FERONATO, *et al.*, 2017, que utilizaram os oligonucleotídeos forward e reverse: 5'-TTCCACTCCACCGACAACG-3' e 5'-GATACCTTCCCACCCTTGC-3', respectivamente. O cDNA e demais componentes da reação totalizaram um volume de 25 microlitros, contendo 12,5 uL de Mix, 10 pmol de cada oligonucleotídeo mencionado, 2uL de cDNA e 8,5uL de água livre de RNase foram submetidos às temperaturas: Desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por um minuto, compreendidas por desnaturação, anelamento e extensão, e com etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos. O produto de PCR obtido foi armazenado a 20°C até a sua posterior utilização.

A reação de Nested PCR foi realizada, também baseada na metodologia de FERONATO, *et al.*, 2017. Os oligonucleotídeos utilizados foram: forward: 5'ACTGACACCGATTTCTCTG-3' e reverse: 5'-CTAAAGTAAGTGAAACAGGC-3', que possibilitou a amplificação de uma região referente ao fragmento genético da proteína estrutural VP1, representada por 316 pares de bases.

Tal reação resultou em um volume final de 50uL, contendo 25uL de Mix, 20pmol de cada oligonucleotídeo, 2uL do produto de PCR, e 19uL de água livre de RNase. As temperaturas utilizadas, foram: 94°C de desnaturação, além de 30 ciclos de 94°C de desnaturação por 1 minuto, 52°C a 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Uma fração de 10uL do produto desta reação foi submetido a eletroforese, a fim de se observar as bandas com os pares de bases mencionados. O restante do volume do produto foi enviado a um laboratório comercial qualificado para a realização de sequenciamento por eletroforese capilar.

4.10. Sequenciamento

Para a análise de sequenciamento, foi eleito o método de sequenciamento por eletroforese capilar, a fim de verificar a identidade nucleotídica e propriedades moleculares do vírus detectado pela PCR. Os *amplicons* obtidos na reação de Nested-PCR mencionada em 4.9 foram enviadas ao laboratório ACTGene (<https://actgene.com.br/>) para confecção da etapa de sequenciamento.

A edição das sequências e a montagem do *denovo* foram realizadas com o programa computacional Geneious v2023.1 (Kearse et al. 2012). Foram baixadas 47 sequências adicionais disponíveis no GenBank. As sequências foram alinhadas usando MAFFT v.7 (Kato e Standley 2013) com parâmetros padrão. A abordagem de Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com o modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura 1980) no MEGA X (Kumar 2018).

4.11. Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente utilizando frequências absolutas e médias aritméticas. Para avaliar associação entre variáveis dependentes categóricas (soropositividade ou PCR-positivo) e independentes (diferentes categorias, como: matrizes, maternidade, creche, crescimento e terminação) realizou-se o teste de Chi-quadrado de Person (para sorologia) ou o teste exato de Fisher, dependendo da exigência do teste. As análises estatísticas de variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste One-way ANOVA e para testar a homocedasticidade dos dados, realizou-se o teste de Bartlett. Para avaliar as relações entre as médias das categorias totais, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para avaliar as associações de risco de infecção entre duas categorias (bivariada) de produção: matrizes, maternidade, creche, crescimento e terminação, realizou-se avaliação comparativa dicotômica com obtenção de razão de chance (OR), quando realizado o Chi-quadrado ou Teste exato de Fisher. Todas as análises estatísticas e os gráficos foram realizados por meio do programa GraphPad Prism® versão 8.0.2, considerando o intervalo de confiança de 95% e $P \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Detecção de RNA viral por PCR em Tempo Real em diferentes categorias

Das granjas abordadas no presente estudo, obtiveram-se positividade por meio da PCR em tempo real nas granjas 1 e 5. Na granja 1 foi detectada positividade de um total de 19% dos animais, sendo 1 matriz, 9 leitões de maternidade, 1 animal da fase de crescimento e 8 suínos da fase de terminação. Na granja 2 encontraram-se positividade a partir das fezes também de 19% dos animais, sendo de 16 leitões de maternidade, e 3 leitões da fase de creche. Nas demais granjas estudadas não foi detectado o RNA viral a partir das amostras de fezes coletadas.

5.2. Detecção de anticorpos neutralizantes nas diferentes fases

No presente estudo foi possível observar dentre as diversas amostras, soros positivos e negativos. No primeiro, na técnica de soroneutralização, puderam observar uma monocamada de células íntegra, com preservação na estrutura celular e cobertura celular por toda a extensão da superfície do poço de cultivo, enquanto no segundo foi possível perceber destruição celular, com perda de continuidade da monocamada celular, arredondamento e lise das células.

Das amostras coletadas, somente as oriundas da granja 2 não apresentou atividade de anticorpos no ensaio de soroneutralização. Nas demais granjas, observaram-se atividade de anticorpos neutralizantes desde a diluição de 1:4 até 1:16384

A granja 1, apresentou 55% de positividade total sorológica, sendo de 19 matrizes (95%), 9 leitões de maternidade (45%), 3 leitões de creche (15%), 4 animais de crescimento (20%), e 20 suínos de terminação (100%). Na granja 2, todas as amostras analisadas apresentaram títulos de anticorpos menores que 4, onde, no presente estudo, foi considerado que não houve detecção de atividade de anticorpos neutralizantes. A granja 3, demonstrou 52% de positividade total, com 10 matrizes (50%), 18 leitões de maternidade (90%), 13 leitões de creche (65%), 8 animais de crescimento (40%), e 3 animais da fase de terminação (15%). Na granja 4, obteve-se 65% de animais positivos, distribuídos em 15 em matrizes (75%), 17 em maternidade (85%), 12 em creche (60%), 13 animais em crescimento (65%), e 8 em animais de terminação (40%). A granja 5 apresentou um percentual de 80% total de positividade, sendo que desses animais, 20 eram matrizes (100%), 15 leitões de maternidade

(75%), 15 leitões de creche (75%), 10 animais de crescimento (50%), e 20 animais de terminação (100%). Na figura 3, é possível observar o perfil sorológico, que possibilita uma melhor compreensão a respeito da positividade encontrada em cada granja, e em suas respectivas fases de produção.

Ao considerar a análise quantitativa, ainda com o método de soroneutralização, observou-se uma variabilidade nos resultados obtidos a partir das amostras analisadas. Na granja 1, obtiveram-se atividade de anticorpos neutralizantes desde a diluição de 1:4 a 1:16384, onde a maior titulação encontrada foi em 2 matrizes. Na granja 2, como mencionado anteriormente, não apresentou presença de atividade de anticorpos neutralizantes. Na granja 3, foi observada atividade de anticorpos neutralizantes, da diluição de 1:4 até 1:8192, onde nesta maior diluição, os animais acometidos foram 2 matrizes e 3 leitões de creche. Na granja 4, a quantificação encontrada foi desde a diluição de 1:4 até 1:8192, sendo este maior título representado por 1 matriz, 1 leitão de maternidade, e 1 animal de creche. Já na granja 5, encontraram atividade de anticorpos neutralizantes com a diluição de 1:4, se estendendo até a diluição de 1:8192, sendo esta maior representada por 1 leitão da fase de maternidade. A tabela mostra o número de animais positivos por meio do ensaio sorológico, bem como a titulação encontrada em cada um.

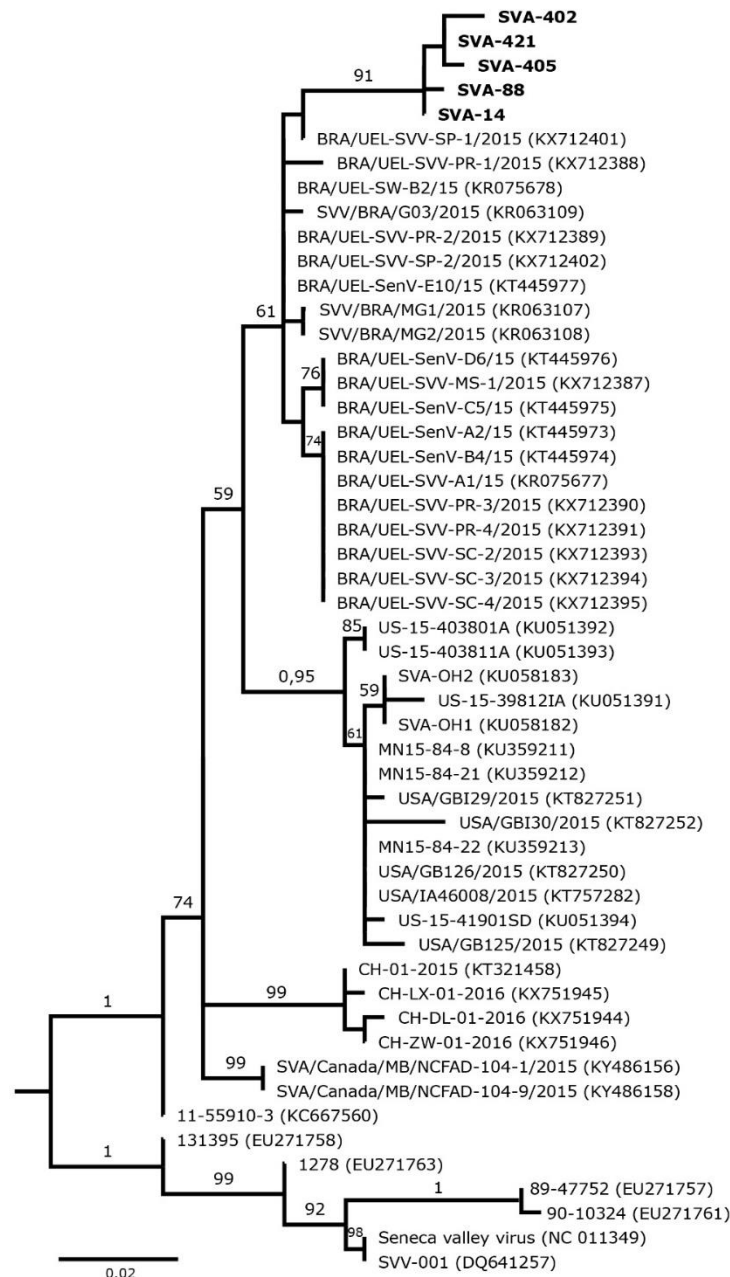
5.3. Nested PCR

Houve amplificação dos fragmentos de cinco amostras selecionadas, o que foi confirmado com a eletroforese em gel, explicitando a região demarcada em 316 pares de bases, conforme a referência bibliográfica utilizada como base para a realização do Nested PCR.

5.4- Sequenciamento

Através da análise de sequenciamento dos amplicons obtidos, pôde-se afirmar que realmente tal fragmento se referia ao *Senecavirus A*. Como é observado na árvore filogenética, a região do genoma viral se assemelha geneticamente a cepas brasileiras (UEL) depositadas no Gen Bank (Figura 2). As cepas SVA-14 e SVA-421 apresentaram 99,7% de identidade com a amostra brasileira MZ032152, já as cepas SVA-88, SVA-405 e SVA-402 apresentaram uma identidade de 99,5%, 99,3% e 99,2% com a amostra MZ032152, respectivamente

Figura 2: Árvore filogenética baseada no método de máxima verossimilhança construída com o modelo Kimura de dois parâmetros baseado na sequência nt parcial da região genômica VP1 das cepas de *Senecavirus A* obtidas neste estudo (sequências em negrito) e outras disponíveis no GenBank. Os números de acesso do GenBank são dados entre parênteses. Os números nas ramificações referem-se a valores de significância de 1.000 réplicas de bootstrap. Valores $\leq 50\%$ não são mostrados.

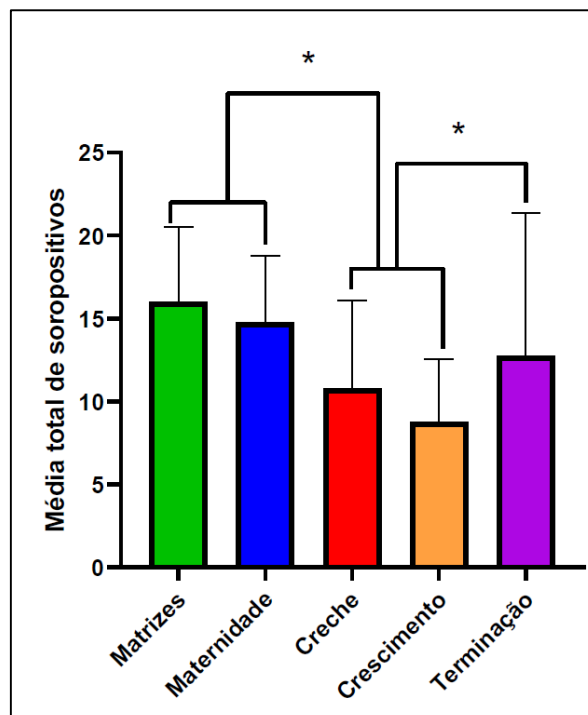


5.5. Análise sorológica e PCR positivos

Foram analisados os números de animais positivos por categoria, de acordo com o método diagnóstico empregado. Sempre foi definida a suína matriz como referência, por ser uma categoria considerada uma importante fonte na cadeia produtiva. Nesse sentido, ela foi inserida como um fator de exposição, sempre comparando-a com as demais. Por meio do teste de chi quadrado, foi analisada a comparação entre as características dicotômicas, comparando as fases de criação.

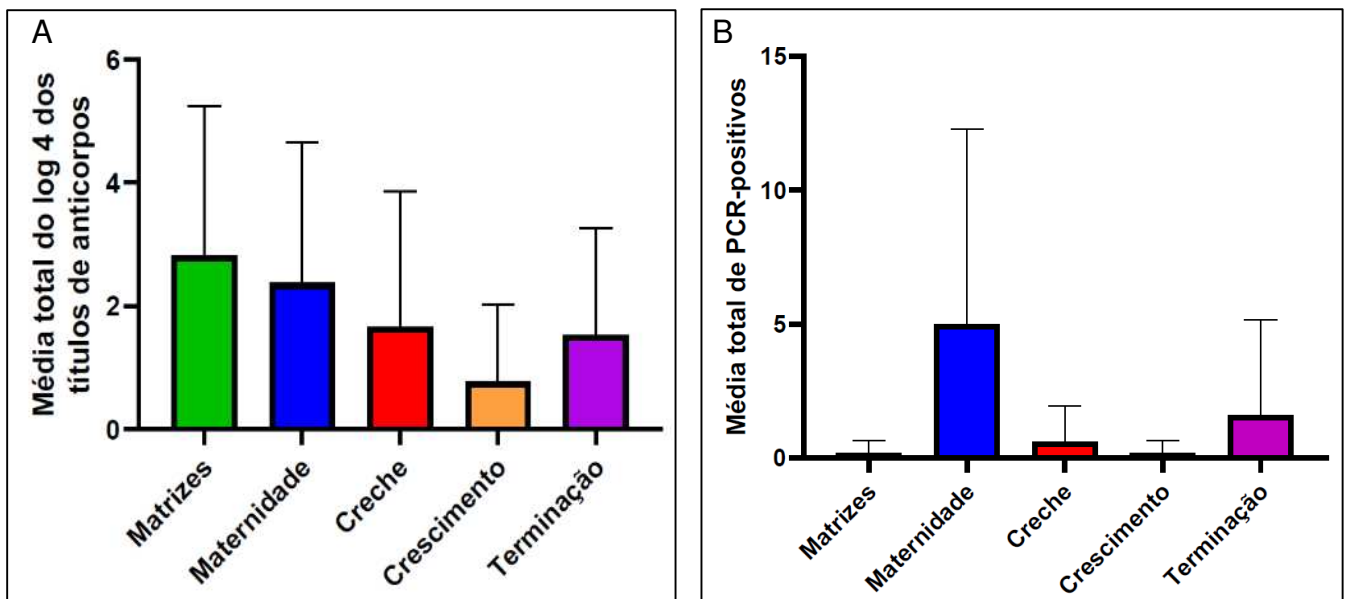
Ao considerar a análise e a figura 3, é possível perceber que matrizes e leitões de maternidade apresentaram maior número de indivíduos com presença de anticorpos com diferenças estatísticas significativas em relação ao crescimento e a creche, que por sua vez, também são diferentes quando comparados com a terminação, sendo esta a se apresentar com positivities maiores. Não houve diferença entre matrizes e leitões de maternidade, em relação as outras fases. Matriz, animais de maternidade e terminação foram os mais importantes de acordo com a análise, e não houve diferença estatística entre creche e crescimento em relação à soropositividade.

Figura 3: Média dos soropositivos de cada fase de criação, representando todas as granjas analisadas no experimento.



Na figura 4A, considerando-se as médias dos logs de anticorpos dos ensaios de todas as granjas, observaram destaque de positivities sorológicas entre as fases de matrizes e de maternidade, com títulos de anticorpos mais altos, se diferenciando estatisticamente em posição superior, seguida então de semelhança estatística entre as fases de creche e terminação com um menor nível do título de anticorpos. Quanto à fase de crescimento, foi possível notar menor intensidade nos títulos de anticorpos detectados nos ensaios.

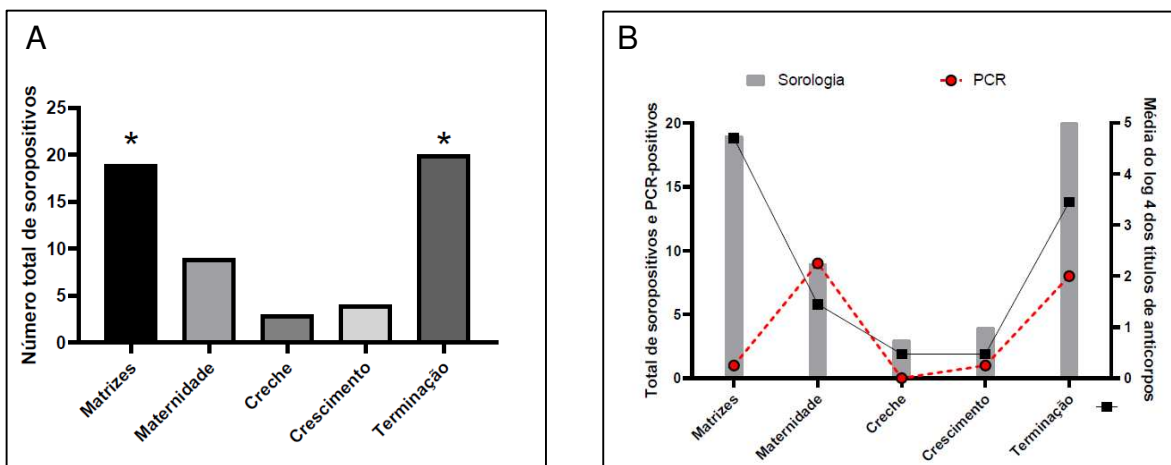
Figura 4. Média dos títulos de anticorpos e RNA viral por cada fase de criação. A: Média total dos Log4 dos títulos de anticorpos de cada fase de criação, de todas as granjas analisadas. B: Média total de cada fase de criação dos animais positivos por meio da técnica de PCR em tempo real



Destacando-se a figura 4B, com ênfase na análise de PCR, observaram-se destaque no ponto de vista estatístico em fase de maternidade, com maiores positivities, seguida da fase de terminação e creche, respectivamente. As fases de matrizes e crescimento se mostraram semelhantes estatisticamente, inferior às demais fases estudadas, com apenas um animal em cada fase mencionada.

Considerando a granja 1, e com base nas figuras 5A e 5B, é possível observar que os resultados das matrizes e dos animais de terminação foram estatisticamente mais altos que as demais categorias, considerando a soropositividade, tendo resultados significativos diante todas as demais, exceto terminação, que foi estatisticamente semelhante que a fase de matrizes. Ao considerar a média dos títulos de anticorpos encontrados, foi possível notar que tal referência foi estatisticamente mais intensa para matrizes, seguida de terminação e maternidade. Nas fases de creche e crescimento, observaram-se semelhança estatística, com intensidade mais baixa nos títulos de anticorpos. Em relação à PCR, notaram-se semelhança estatística entre as fases de maternidade e terminação, além de semelhança entre matrizes e crescimento, e negatividade em fase de creche.

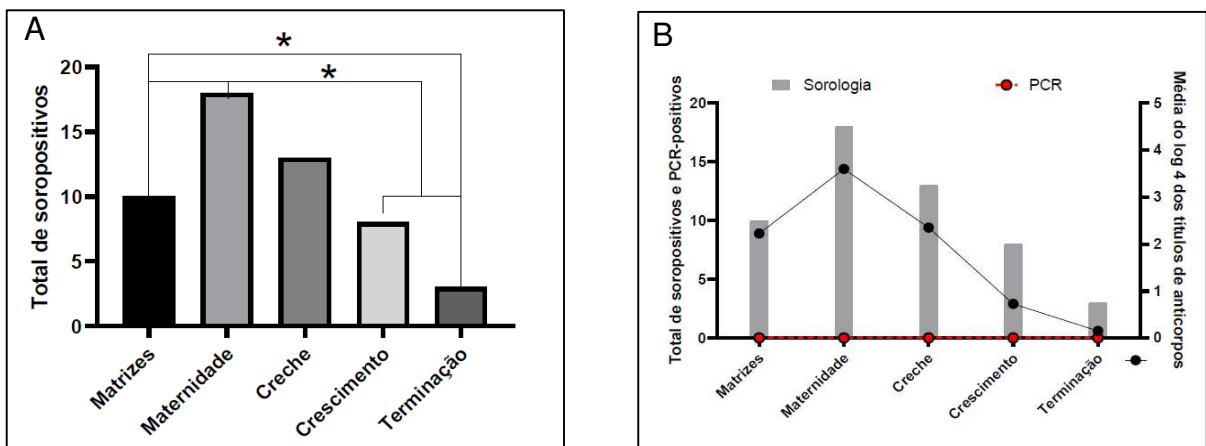
Figura 5. Número de soropositivos, média dos Log4 de anticorpo e PCR positivos na granja 1. A: Número total absoluto de soropositivos na granja 1, considerando suas respectivas fases de produção. B: Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 1 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade



Na granja 3, a fase de maternidade, a positividade sorológica foi superior do que as demais, tendo destaque quando comparada pelo parâmetro de número de animais soropositivos. O resultado das matrizes foi estatisticamente diferente dos animais da fase de terminação apenas, enquanto o resultado da maternidade foi estatisticamente diferente dos animais da fase de crescimento e de terminação;

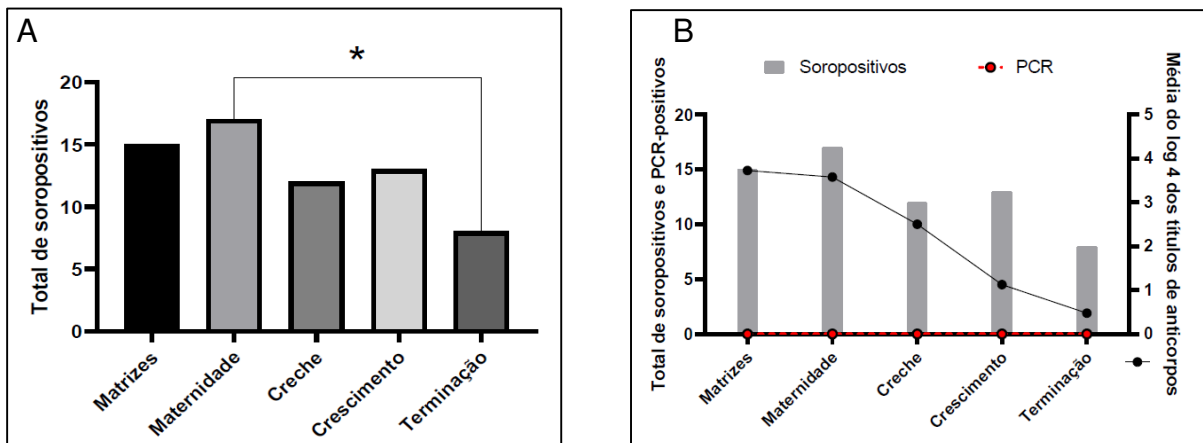
Considerando-se a análise sorológica, observaram-se maior intensidade estatisticamente em fase de maternidade, seguida de semelhança entre matrizes e animais de creche. Crescimento e terminação mostraram-se inferiores, de forma decrescente, respectivamente; Destaca-se ainda que a técnica de PCR constatou negatividade para todas as fases de produção. Tais dados são ilustrados nas figuras 6A e 6B.

Figura 6. Número de soropositivos, média dos Log₄ de anticorpo e PCR positivos na granja 3. A: Número total absoluto de soropositivos na granja 3, considerando suas respectivas fases de produção. B: Média do Log₄ dos títulos de anticorpos dos animais da granja 3 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade



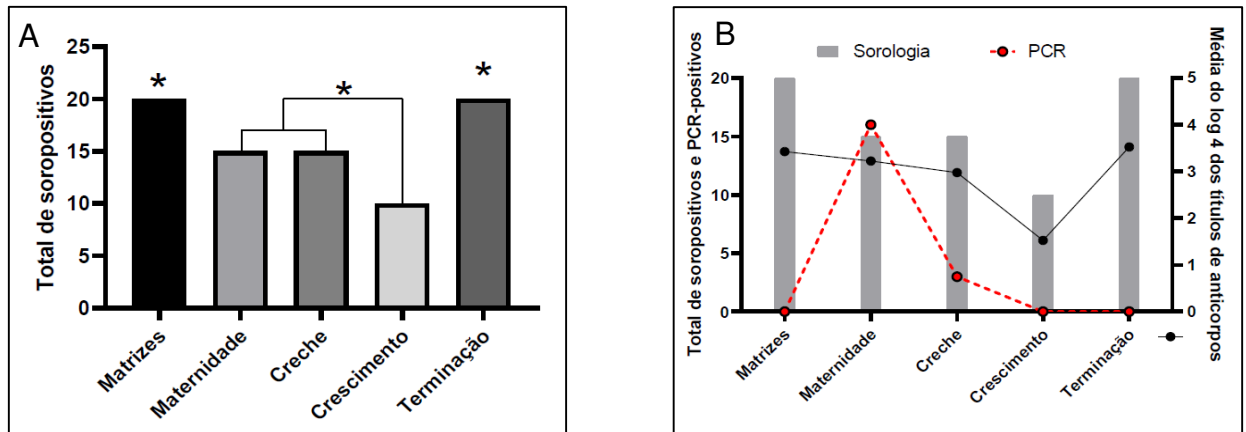
Ao analisar os resultados da granja 4, verificaram que animais de maternidade foram estatisticamente diferentes de forma significativa apenas com a fase de terminação. Na sorologia quantitativa, foi possível notar semelhança estatística entre as fases de matrizes e maternidade, com decaimento dos níveis de anticorpos nas demais fases de creche, crescimento e terminação, respectivamente. Em relação a PCR, todas foram negativas. Tais resultados são ilustrados pelas figuras 7A e 7B.

Figura 7. Número de soropositivos, média dos Log4 de anticorpo e PCR positivos na granja 4. A: Número total absoluto de soropositivos na granja 4, considerando suas respectivas fases de produção. B: Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 4 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade





















































Em relação à granja 5, sob o auxílio das figuras 8A e 8B, foi possível verificar que o número de animais soropositivos das categorias de matrizes e animais de terminação foram estatisticamente superiores em relação ao número de animais soropositivos da fase maternidade, creche e crescimento. Leitões de maternidade e de creche tiveram diferença estatística, quando comparadas com a fase de crescimento. Quanto à análise de títulos de anticorpos, observaram-se semelhança estatística entre todas as fases, com exceção da fase de crescimento que se demonstrou títulos de anticorpos inferiores. Na técnica de PCR, se sobressaiu a fase de maternidade, com maior detecção do RNA viral, seguida da fase de creche, ainda com uma importante diferença. Enquanto as demais fases não apresentaram positividade.

Figura 8. Número de soropositivos, média dos Log4 de anticorpo e PCR positivos na granja 5. A: Número total absoluto de soropositivos na granja 5, considerando suas respectivas fases de produção. B: Média do Log4 dos títulos de anticorpos dos animais da granja 5 e número absoluto de positividade em PCR na propriedade



Na comparação realizada entre as fases de produção nas granjas estudadas, a qual está ilustrada na figura 9, pode-se observar imagens em verde que mostram diferença estatística, e em vermelho, que não há tal diferença. Há uma heterogeneidade entre as granjas, com destaque na comparação entre maternidade e terminação, uma vez que há diferenças estatísticas entre elas no método sorológico qualitativo, o que é ilustrado na figura 9. Na granja 2 foi irrelevante tal análise, pelo motivo de esta se apresentar negativa, tanto no âmbito sorológico quanto molecular.

Figura 9: Avaliação de relação de significância entre as fases de criação de suínos soropositivos, em análise qualitativa, onde verde mostra diferença estatística entre as fases, e em vermelho onde tal diferença não ocorre.

CATEGORIAS	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5
Matriz vs Maternidade					
Matriz vs Creche					
Matriz vs Crescimento					
Matriz vs Terminação					
Maternidade vs Creche					
Maternidade vs Crescimento					
Maternidade vs Terminação					
Creche vs Crescimento					
Creche vs Terminação					
Crescimento vs Terminação					

6. DISCUSSÃO

A infecção e doença causada pelo *Senecavirus A* é de suma importância para a suinocultura, uma vez que pode afetar a saúde e bem-estar dos animais, com importantes perdas zootécnicas, como também trazer sérios prejuízos, uma vez que se trata de uma doença vesicular, o que acarreta em trâmites indispensáveis na cadeia produtiva e sanitária de produção de produtos de origem animal. Trata-se de um grande desafio trazido de um vírus pequeno, não envelopado, de difícil controle, sem predileção de idade, com perfil de resistência no ambiente e potencial perpetuação nas propriedades (HAWKO et al., 2022). Este estudo trouxe importantes colocações a respeito de granjas expostas naturalmente pelo SVA em anos anteriores, ressaltando que os rebanhos não foram vacinados para a doença, e também não manifestaram sintomatologia clínica relacionada a infecção pelo SVA.

De acordo com a análise da PCR em tempo real, a positividade mencionada nos animais das granjas 1 e 5 se justificam pela excreção do RNA viral nas fezes coletadas, o que fundamenta a afirmação de (JOSHI et al., 2016), quando descreve a excreção viral pelas vias nasal, fecal e oral. Ainda sobre esta positividade nas propriedades em questão, percebe-se um alinhamento com as ideias de (JOSHI et al., 2016), os quais afirmaram que a presença do vírus em instalações, ambientes, moscas e demais espécies de animais, sendo estes veículos de extrema capacidade de transmissão do vírus, trazendo desafios para controle e erradicação do mesmo que já é endêmico no país (MULLER et al., 2020).

Em relação às fases pelas quais apresentaram-se positividade para infecção viral, é possível perceber uma presença marcante em matrizes, que são animais alojados por longo período, sendo altamente desafiados e expostos aos patógenos que uma granja pode conter. Embora há relatos de doenças pelo SVA em animais com idade, sexo ou fase de produção diferentes conforme (VIEIRA et al., 2022), percebe-se que as matrizes foram as mais desafiadas no estudo.

Por ser uma infecção transiente, é plausível que nem todos os animais apresentem excreção viral, pois uma provável infecção pode ter cessado antes que fosse realizada a coleta dos materiais biológicos para o presente estudo (LIU et al., 2020).

Em relação à técnica de soroneutralização, se faz válido mencionar que um soro positivo contém anticorpos específicos, que impedem que o vírus atinja a monocamada celular, e, por conseguinte, ela se mantenha íntegra, diferentemente do

soro negativo que, na ausência de anticorpos neutralizantes, o vírus atue livremente na monocamada celular pela qual ele tenha tropismo, gerando destruição e alteração celular (FLORES, 2007). A positividade encontrada nos ensaios se justifica pelo fato de que os animais em questão tiveram contato prévio com o vírus, apresentando então resposta imunológica, em diferentes intensidades, o que é mencionado na tabela 2. É importante mencionar que a granja 2 não apresentou atividades de anticorpos nas diluições realizadas. JOSHI et al., 2016 observaram resposta imunológica frente ao SVA, com produção de anticorpos neutralizantes, do 5º ao 38º dia pós infecção viral. Por outro lado, GOOLIA et al., 2017 mostraram em seu trabalho que, após 180 dias de infecção, já puderam observar decaimento de anticorpos em alguns animais. Nesse sentido, é possível inferir que não havia desafio pelo Senecavirus no momento da coleta há pelo menos 180 dias antes da coleta na propriedade, considerando que esta granja já era povoada com animais diferentes daqueles que passaram pelo desafio da doença. Ademais, exalta-se a importância de um bom manejo de biossegurança para erradicação da doença, mesmo diante do fato de o vírus ser endêmico, juntamente com todos os desafios que isto traz para a cadeia produtiva animal e saúde única (BAKER et al., 2017) (PREIS et al., 2022).

É válido ressaltar que a positividade em matrizes é marcante em todas as propriedades positivas nos ensaios sorológicos, principalmente nas granjas 1 e 4. Tratam-se de animais sempre muito desafiados, por consequência dos longos tempos de permanência na granja, com grandes oscilações hormonais, como também é importante considerar sua alta rotatividade necessária nas fases de produção (HOUSTON; TEMEEYASEN; PIÑEYRO, 2020).

Através do sequenciamento foi possível notar que o RNA viral detectado nos animais do experimento manteve coerência com a realidade da região, se equiparando às cepas brasileiras, que certamente circulam desde sua detecção no país, e desafiam diversas propriedades suinícolas, acarretando muitas vezes em doenças vesiculares (FERONATO, *et al.*, 2017).

Em se tratando dos animais positivos sorologicamente na fase de maternidade, muito provável a detecção de anticorpos provenientes de imunidade passiva, por meio de colostragem, apesar de isso não anular a ocorrência de infecção natural e resposta imunológica dos animais submetidos ao estudo (MAGGIOLI et al., 2019b). Na fase de creche, um ponto crítico a ser analisado, é a intensidade do estresse que o animal é exposto, uma vez que há mudança brusca em sua vida, somado à separação da mãe

e interação com outros indivíduos nas baias. É conhecido que o estresse é fator predisponente para infecções diversas, não diferente com o SVA. Há possibilidade de imunossupressão, e baixas respostas humorais frente a tal desafio, embora ainda assim títulos altos tenham sido encontrados nessa fase de criação, principalmente nas granjas 3 e 4 (MONTIEL et al., 2016).

Um decaimento no número de animais positivos em sorologia qualitativa e quantitativa na fase de animais de crescimento pode ser justificado pelo pico de decaimento de prováveis anticorpos maternos (HOUSTON et al., 2019). É uma fase importante na qual os animais iniciem mais autonomia imunológica, frente aos desafios naturais que os animais dessa fase são submetidos. É possível a ocorrência de infecção natural, mesmo em fases de criação anteriores, justificando respostas imunológicas e produção de anticorpos neutralizantes em alguns animais. Também é um ponto importante a ser estudado para fins de protocolos vacinais, pelo provável decaimento de anticorpos e autonomia imunológica (LIU et al., 2022).

Para os animais da fase de terminação, importante se faz colocar a consideração de que são animais mais velhos, cuja trajetória na granja permita maior possibilidade de exposição à infecção viral, com consequente produção de anticorpos neutralizantes, somada a maturidade imunológica com produção de anticorpos, mesmo que não tão intensa (HOUSTON et al., 2019).

É muito importante ressaltar que a individualidade de cada animal e o ambiente ao qual ele é exposto condiz muito com seu perfil sorológico em uma determinada propriedade (MAGGIOLI et al., 2019b). Tal fato pode justificar as oscilações entre o perfil sorológico e titulação de anticorpos constatados no experimento em cada granja.

Doenças virais sempre foram desafiadoras para animais e humanos, uma vez que há limitações em tratamentos para a solução da problemática (MORENS; FAUCI, 2020). Embora já existam vacinações para profilaxia da doença causada pelo SVA, medidas de biossegurança estão dentre as mais importantes para o controle de enfermidades infecciosas. Nesse sentido, PREIS et al., 2022 ressalta que básicas ações como estas resultam em proteção aos plantéis frente as ameaças biológicas, promovendo uma criação mais segura e produtiva.

7. CONCLUSÕES

É irrefutável que a presença de infecção sem ocorrência de sinais clínicos da doença é real no presente estudo, e pode ser fator ímpar em se tratando da evolução e perpetuação do agente nas propriedades ou mesmo na região em que o mesmo se instala, isso é explicado pelas positivities em PCR, em 3,8% dos animais estudados, em duas granjas, ou seja, nelas o material genético do vírus foi encontrado. A distribuição e resposta imunológica de 50,4% dos animais soropositivos em todas as propriedades, exceto a granja 2, mostraram importantes pontos de controle e monitoração, sendo a sorologia fator primordial na rotina de produção suinícola, promovendo um melhor controle de sanidade e de eficiência produtiva dos plantéis, uma vez que isso conforma o contato dos animais com o vírus. Ademais, tal método diagnóstico permite verificar a resposta imunológica dos animais frente às infecções, com presença de anticorpos, em diferentes intensidades conforme foi mostrado no estudo.

REFERÊNCIAS

ALEXANDERSEN, S. et al. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 4, p. 268–282, 2003.

BAKER, K. L. et al. Systematic Epidemiological Investigations of Cases of Senecavirus A in US Swine Breeding Herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 11–18, fev. 2017.

BRACHT, A. J. et al. Real-time reverse transcription PCR assay for detection of senecavirus a in swine vesicular diagnostic specimens. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

BRASIL, G. F. DO.; MAPA, M. DA A. P. E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nr. 44, 0210/2007. **Instrução Normativa Mapa nº44, de 2 de outubro de 2007.**, v. 2007, n. Diário Oficial da União Nº 191, p. 2–10, 2007.

BUCKLEY, A.; LAGER, K. Efficacy of an inactivated Senecavirus A vaccine in weaned pigs and mature sows. **Vaccine**, v. 40, n. 12, p. 1747–1754, mar. 2022.

CANNING, P. et al. Neonatal Mortality, Vesicular Lesions and Lameness Associated with Senecavirus A in a U.S. Sow Farm. **Transboundary and emerging diseases**, v. 63, n. 4, p. 373–378, 2016.

DALL AGNOL, A. M. et al. A TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets. **Molecular and Cellular Probes**, v. 33, p. 28–31, 2017.

FERONATO, Cesar et al. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis. **Tropical animal health and production**, v. 50, p. 337-344, 2018.

FLORES, Eduardo Furtado. **Virologia Veterinária**. 3ed. Santa Maria-RS: Editora da UFSM, 2007. P. 316

GOOLIA, M. et al. Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 2, p. 250–253, 2017.

GUO, B. et al. Novel senecavirus a in swine with vesicular disease, United States, July 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1325–1327, 2016.

GUO, Z. et al. Isolation of Three Novel Senecavirus A Strains and Recombination Analysis Among Senecaviruses in China. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. January, p. 1–6, 2020.

HAWKO, S. et al. A Review on Pathological and Diagnostic Aspects of Emerging Viruses—Senecavirus A, Torque teno sus virus and Linda Virus—In Swine. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, p. 495, 10 set. 2022.

House JA, Baker JA. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Vet**, 61(1971), pp.320-335.

HOUSTON, E. et al. Seroprevalence of Senecavirus A in sows and grower-finisher pigs in major swine producing-states in the United States. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 165, p. 1–7, abr. 2019.

HOUSTON, E.; TEMEEYASEN, G.; PIÑEYRO, P. E. Comprehensive review on immunopathogenesis, diagnostic and epidemiology of Senecavirus A. **Virus Research**, v. 286, n. March, p. 198038, 2020.

JOSHI, L. R. et al. Pathogenesis of senecavirus a infection in finishing pigs. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3267–3279, 2016a.

JOSHI, L. R. et al. Pathogenesis of senecavirus a infection in finishing pigs. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3267–3279, 2016b.

JOSHI, L. R. et al. Detection of the emerging picornavirus senecavirus a in pigs, mice, and houseflies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1536–1545, 2016c.

JOSHI, L. R. et al. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3267–3279, 16 dez. 2016d.

JOSHI, L. R. et al. Genetic diversity and evolution of the emerging picornavirus Senecavirus A. **Journal of General Virology**, v. 101, n. 2, p. 175–187, 2020.

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

LEME, R. A. et al. Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 6, p. 603–611, 2015a.

LEME, R. A. et al. Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 6, p. 603–611, 2015b.

LEME, R. A. et al. A new wave of Seneca Valley virus outbreaks in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 3, p. 1101–1104, 2019.

LEME, R. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Update on senecavirus infection in pigs. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 1–15, 2017.

LIU, F. et al. A 5-Year Review of Senecavirus A in China since Its Emergence in 2015. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 567792, 30 set. 2020.

LIU, W. et al. Evaluation of Immunoreactivity and Protection Efficacy of Seneca Valley Virus Inactivated Vaccine in Finishing Pigs Based on Screening of Inactivated Agents and Adjuvants. **Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 631, 18 abr. 2022.

MAGGIOLI, M. F. et al. Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs. **Journal of Virology**, v. 92, n. 3, p. 1–17, 2017.

MAGGIOLI, M. F. et al. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets. **Journal of Virology**, v. 93, n. 21, p. 1–19, 2019a.

MAGGIOLI, M. F. et al. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets. **Journal of Virology**, v. 93, n. 21, p. 1–19, 2019b.

MAPA. Erradicação e a Prevenção da Febre Aftosa. v. 2007, 2007.

MARQUES, G. H. F. et al. A experiência brasileira na erradicação da febre aftosa e o emprego do sistema I-ELISA 3ABC/EITB para certificação sanitária de bovinos e bubalinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–11, 2016.

MARTINS, F. M.; TRIENEKENS, J.; OMTA, O. Differences in quality governance: the case of the Brazilian pork chain. **British Food Journal**, v. 119, n. 12, p. 2837–2850, 2017.

MILES, L. A. et al. Anthrax toxin receptor 1 is the cellular receptor for Seneca Valley virus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 8, p. 2957–2967, 2017.

MONTIEL, N. et al. Vesicular Disease in 9-Week-Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1246–1248, jul. 2016.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1077–1092, set. 2020.

MU, S. et al. Development of a novel SYBR green I-based quantitative RT-PCR assay for Senecavirus A detection in clinical samples of pigs. **Molecular and Cellular Probes**, v. 53, n. August, p. 101643, 2020.

MULLER, M. et al. Senecavirus A (SVA) in finishing swine: diagnosis and viral isolation. **Ciência Rural**, v. 50, n. 7, p. e20191024, 2020.

NÄÄS, I. DE A. Rastreabilidade e Certificação de Suínos no Brasil. **2ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**, p. 452, 2002.

OLIVEIRA, T. E. S. et al. Histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural evidence of spontaneous Senecavirus A-induced lesions at the choroid plexus of newborn piglets. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

PATON, D. J.; GUBBINS, S.; KING, D. P. Understanding the transmission of foot-and-mouth disease virus at different scales. **Current Opinion in Virology**, v. 28, n. Figure 2, p. 85–91, 2018.

PEZZONI, G. et al. Diagnostic Performances of Different Genome Amplification Assays for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus in Relation to Genomic Lineages That Circulated in Italy. **Viruses**, v. 12, n. 11, 2020.

PINHEIRO-DE-OLIVEIRA, T. F. et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR to identify the emerging vesicular virus Senecavirus A in biological samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 3, p. 1360–1369, 2019.

PREIS, G. et al. Senecavirus A seroprevalence and risk factors in United States pig farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1011975, 20 out. 2022.

QIAN, S. et al. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 4–7, 2016.

RIET-CORREA, F. et al. **Viroses confundíveis com febre aftosa. Ciência Rural**, 1996.

RODRIGUES, R. PECUÁRIA ABASTECIMENTO , no uso da atribuição que lhe confere o art . 4º , do Decreto no 5 . 351 , de 21 de janeiro de 2005 , e o que consta do Processo no Art . 1º Aprovar o Regimento Interno dos Agropecuários , na forma do Anexo à presente Portaria . La. 2006.

ROSSMANN, M. G.; HE, Y.; KUHN, R. J. Picornavirus-receptor interactions. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 324–331, 2002.

SANTOS, D. E. et al. Avanços em programas de biossegurança para a suinocultura Advances in biosecurity programs in pig production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 33–46, 2008.

SAPORITI, V. et al. A ten years (2007–2016) retrospective serological survey for Seneca Valley virus infection in major pig producing states of Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 41, n. 4, p. 317–321, 2017.

SEGALÉS, J. et al. Senecavirus A. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 11–21, 2017.

SOUZA, H. C. Production costs of pigs: study in the main producing states of Brazil. p. 24, 2017.

SU, E. DOENÇAS EXÓTICAS E EMERGENTES , ENTENDENDO O PROBLEMA E PREPARANDO PARA O DESAFIO Danielle Gava Introdução Impacto das doenças exóticas , emergentes e reemergentes em suínos Olhando o cenário como saúde única Estamos preparados para o desafio ? p. 38–42, 2019.

VIEIRA, M. V. et al. The third wave of Seneca Valley virus outbreaks in pig herds in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1701–1706, set. 2022.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; DE BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 2016.

ZELL, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 10, p. 2421–2422, 2017.

ZHANG, J. et al. Genetic evolution and epidemiological analysis of Seneca Valley virus (SVV) in China. **Virus Research**, v. 291, n. October 2020, p. 198177, 2021.

ZHANG, Z. et al. Complete Genome Sequence of a Novel Senecavirus A Isolate from an Asymptomatic Pig in China. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 14, p. 1–2, 2019.