UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Brenda Monique Magalhães Rocha

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O *SENECAVIRUS A* EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

Belo Horizonte

Fevereiro de 2022

Brenda Monique Magalhães Rocha

Versão Final

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O *SENECAVIRUS A* EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Linha de Pesquisa: Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais.

Orientadora: Prof.ª Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte

Fevereiro de 2022

R672d

Rocha, Brenda Monique Magalhães,1994 -
Desenvolvimento da técnica de imunoperoxidase em monocamada de células para detecção de anticorpos contra o senecavirus a em amostras de soro de suínos / Brenda Monique Magalhães Rocha. – 2022.
65 f. il

Orientadora: Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.
Bibliografias: f. 52 a 57.
Anexos: f: 58 a 63.

1. Leitão – Suíno -Teses - 2. Vacina - Veterinária - Teses – 3. Ciência animal – Teses – I. Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - BRENDA MONIQUE MAGALHÃES ROCHA

Às 08:30 horas do dia 24 de fevereiro de 2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

" DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O *SENECAVIRUS A* EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS"

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal,** área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva.** Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof.(a) / Dr. (a)	Aprovada	Reprovada
Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes	X	
Marcelo Fernandes Camargos	X	
Erica Azevedo Costa	X	

Face os resultados, a aluna foi considerada:

Aprovada	X	**Reprovada**	

Para concluir o Mestrado, a candidata deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca:

Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes**, **Professora do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa**, **Professora do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Fernandes Camargos**, **Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1277236** e o código CRC **D957FAD0**.

AGRADECIMENTOS

Vou iniciar meus agradecimentos com a mesma frase com a qual finalizei minha apresentação da graduação: “A vida é feita de momentos, e PESSOAS que fazem desses momentos especiais...", pois se consegui chegar até aqui foi por causa dessas pessoas muito importantes que andaram ao meu lado.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, que do jeitinho deles, sempre souberam me apoiar e me incentivar a seguir meu coração. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, e por tornarem meus sonhos possíveis. Agradeço também aos meus avós por cada palavra doce e de apoio, e por todo carinho mesmo não estando tão de perto. Eu os amo muito!

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora, Profª Bel. Obrigada por ter aceitado esse desafio, sei que foram dois anos de muitas batalhas, mas a senhora sempre esteve ao meu lado, apoiando, orientando e trazendo palavras de carinho. Obrigada por ter sempre esse cuidado com todos que estão ao seu redor e por nos mostrar que somos capazes de escalar montanhas. Você é uma pessoa incrível, e te ter por perto é um grande presente da vida. Que possamos continuar essa jornada por mais alguns aninhos...Você é um dos meus maiores espelhos da vida!

Profª Érica, nem sei por onde começar a agradecer, obrigada por sempre ter palavras que funcionam como abraços, nos lembrando da luz que existe em cada um de nós. Obrigada pelas risadas, pelas histórias engraçadas e por nos motivar a sermos pessoas melhores, pesquisadores melhores todos os dias, pois afinal de contas: nós vamos dominar o mundo!

GraGra, você é muito muito importante na minha vida. Sem você este trabalho não teria acontecido, (hahaha) é verdade este bilhete. Durante esses dois anos, criamos uma linda amizade. Tenho muito orgulho de trabalhar com você, de poder aprender todos os dias a ser uma pessoa e uma profissional melhor. Você é meu anjo da guarda e sou muito grata por cada conselho, cada ensinamento que você carinhosamente compartilhou comigo durante esses anos. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Baa, você é minha alma gêmea científica, nossa amizade com certeza veio de outras vidas. Amiga, obrigada por tudo...tudo mesmo, você sempre me mantém de pé, comemora minhas alegrias e acolhe minhas tristezas. Agradeço imensamente por nossos momentos de reflexão, de risadas, nossos lanches no final do dia refletindo o quanto tínhamos trabalhado naquele dia, mas que terminávamos sempre com a sensação de dever cumprido e de que estávamos no caminho certo, mesmo que existissem pedras durante esse percurso. Que nossas histórias sempre se encontrem independentemente, de onde estivermos.

Nágila, você chegou devagarinho no laboratório e fomos construindo uma amizade muito linda, que tenho certeza que será para toda vida. Obrigada por todos os momentos de

risadas, pelas palavras de apoio e por estar ao meu lado em todos os momentos. Você é muito especial.

Agradeço muito as minhas lindas amigas Tayná, Luísa, Mavi, Luli Maia, Gabi, Lari e Luana que mesmo de longe se mantiveram perto, trazendo palavras de conforto e apoio. E também as amigas que o LPVA me deu Ana Fraiha, Bia, Iza vocês são pessoas maravilhosas, trouxeram luz aos meus dias e sempre...sempre tinham aquela palavra de alento, me fazendo acreditar que eu era capaz de continuar caminhando. Obrigada por estarem sempre por perto.

Um agradecimento muito especial ao meu grande companheiro e amigo de vida, João Henrique. Amore, obrigada pelo apoio e pela força diária! Você é muito importante na minha vida, e tem me ajudado a conquistar cada vitória, me levantando todos os dias e mostrando que sou forte. Tenho muito orgulho da pessoa que estamos nos tornamos ao longo de todos esses anos.

Agradeço a toda à equipe do LPVA por todos os momentos de muito trabalho e também de risadas. A professora Zélia pelo carinho e conhecimento compartilhados. A Agda pela ternura e atenção de sempre, atendendo aos nossos pedidos (às vezes de última hora) com muito zelo.

Ao professor Rafael Nicolino por toda atenção, ajuda e colaboração no trabalho.

Agradecer ao professor Roberto Guedes e aos alunos do laboratório de patologia pela colaboração e pela gentileza com que me ajudaram.

Ao pessoal do LFDA-MG, Dr. Marcelo, Aline e Jaqueline, pela parceria e por todo conhecimento compartilhado. Obrigada por terem me acolhido tão gentilmente.

A toda a equipe do COVID, vocês fizeram parte dessa caminhada e gostaria de agradecer pela parceria e conselhos durante esses anos.

E finalmente, agradeço a banca, ao Dr. Marcelo e a Profª Érica, por terem aceitado participar desse momento tão importante, contribuindo imensamente para o crescimento deste trabalho.

“Sonho que se sonha só,
É só um sonho que se sonha só,
Mas sonho que se sonha junto é realidade...”
Raul Seixas

SUMÁRIO

Lista de Figuras 7

Lista de Tabelas 7

Lista de Anexos 8

Lista de Abreviaturas 8

RESUMO.....11

ABSTRACT 12

1. **INTRODUÇÃO** 1

2. **OBJETIVOS** 3

2.1 Objetivo Geral 3

2.2 Objetivos Específicos 3

3. **REVISÃO DE LITERATURA** 3

3.1 Classificação e Morfologia do *Senecavirus A* 3

3.2 Ciclo de Replicação do SVA.....6

3.3 Epidemiologia do *Senecavirus A* 8

3.4 Epidemiologia Molecular do *Senecavirus A*.....11

3.5 Patogenia da Infecção por SVA 13

3.6 Resposta Imune contra SVA 17

3.7 Diagnóstico do *Senecavirus A*.....19

3.8 Prevenção e Controle.....21

3.9 Análise Estatística.....24

4. **MATERIAL E MÉTODOS** 24

4.1 Local de realização do experimento 24

4.2 Cultivo celular.....24

4.3 Amostra viral 25

4.4 Multiplicação da amostra viral SVA LPVA4 25

4.5 Titulação viral SVA LPVA4 26

4.6 Avaliação da cinética viral isolado SVA LPVA4 26

4.7 Amostras de soro de suíno.....26
4.8 Teste Soroneutralização (SN) para SVA 27
4.9 Desenvolvimento da técnica de IPMC para SVA.....28
4.10 Avaliação do desempenho do IPMC para SVA 29
4.11 Análise Estatística.....30
5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....31
5.1 Determinação da Amostra Viral.....31
5.2 Titulação Viral 31
5.3 Cinética de Replicação Viral.....31
5.4 Desenvolvimento da Imunoperoxidase em Monocamadas de Células (IPMC).....32
5.5 Comparação entre os testes de Soroneutralização e IPMC 33
6. **CONCLUSÃO** 38
7. **REFERÊNCIAS**.....1
8. **ANEXOS** 7

Lista de Figuras

Figura 1-	A: Esquema do capsídeo viral de formato icosaédrico dos picornavírus, ilustrando o protômero composto pelas proteínas VP1, VP3 e VP0 (clivada em VP2 e VP4 – compõe a região interna do capsídeo). B: Representação da estrutura dos picornavírus. Fonte: ICTV, 2020	4
Figura 2-	Representação esquemática do genoma do *Senecavirus A.* Fonte: Adaptado de Segalés *et al*., 2017	5
Figura 3-	Esquema do ciclo de replicação da família *Picornaviridae.* 1. Ligação aos receptores celulares; 2. Penetração e desnudamento; 3. Tradução do RNA no sentido positivo; 4. Clivagem dos precursores das proteínas; 5. Replicação do genoma via produção de um RNA antigenômico; 6. Morfogênese; 7. Liberação das partículas virais por lise celular. Fonte: Flores, 2017	7
Figura 4-	Distribuição mundial do *Senecavirus A* de 1988 até 2018. Fonte: Adaptado de Leme *et al*., 2017	9
Figura 5-	Relações evolutivas dos isolados de *Senecavirus A* identificadas nos EUA, Canadá, Brasil, China e Tailândia entre 1988 e 2016. A Árvore filogenética foi construída com base em 56 sequências nucleotídicas parciais (541 pb) da região VP1 (capsídeo viral) do genoma do *Senecavirus*. Fonte: Leme *et al*., 2017	13
Figura 6-	Lesões causadas por infecção natural por SVA. A – Focinho, matriz. Grande vesícula típica de infecção por SVA presente na face dorsal do focinho. B – Casco, matriz. Ulceração da banda coronária. Fonte: Segalés *et al*., 2017	14
Figura 7-	Alterações histológicas observadas em animais inoculados com SVA. Corte histológico da tonsila de um animal infectado com SVA (4° dpi). A – Alterações caracterizadas por hiperplasia linfoide. B – Hibridização *in situ* demonstrando a presença de ácido nucleico do SVA (coloração rósea - seta) nos folículos linfoides. Fonte: Joshi *et al*., 2016a	15
Figura 8-	Sinais clínicos observados em leitões de 28 dias inoculados com SVA. A – Letargia observada no 2° dpi. B – Diarreia causada pela infecção por SVA observada no 3°dpi. Fonte: Liu *et al*., 2021	16
Figura 9-	Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia de leitões recém-nascidos naturalmente infectados por SVA. A – Glossite diftérica. B – Congestão dos vasos meníngeos do cérebro. Fonte: Leme *et al*., 2016;Joshi *et al*., 2016b	17
Figura 10-	Dinâmica de infecção do SVA. Primeiramente, é observado um curto período de incubação (3-5 dias), com duração dos sinais clínicos até 14 dias após a infecção. Pode ser notado uma curta viremia (1-10) fortemente, correlacionada ao rápido aumento de anticorpos neutralizantes detectados a partir do 5° dpi. No 7°dpi é visto o aumento das células T principalmente T $CD4^+$, que também está associada à eliminação da infecção viral. O RNA viral pode ser	19

	detectado nas fezes e secreções oral e nasal até 28 dias pós-infecção, sendo que partículas virais viáveis são isoladas da secreção oral até 21 dpi. Fonte: Adaptado de Maggioli *et al.*, 2018	
Figura 11-	Fluxograma de execução do teste de Soroneutralização do SVA. Fonte: Adaptado de LFDA/2019.	28
Figura 12-	Fluxograma de execução do teste de IPMC do SVA. Fonte: Adaptado de Gerber *et al*., 2011.	30
Figura 13-	A: Efeito citopático característico do SVA – arredondamento celular e destruição da monocamada; B: Controle negativo – monocamada íntegra de células NCI- H1299. Fonte: Arquivo pessoal	31
Figura 14-	Avaliação da cinética de replicação do isolado SVA LPVA4 em células da linhagem NCI-H1299 inoculadas com diferentes concentrações de vírus 0.1MOI, 1 MOI e 10MOI em três tempos de incubação 24, 48 e 72 horas	32
Figura 15-	A: Marcação rosa específica no citoplasma das células observada na amostra de soro suíno positivo; B: Ausência de coloração observada nas amostras de soro negativo. Fonte: Arquivo pessoal	33
Figura 16-	Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos no teste de SN, considerando o ponto de corte de 1:64	35
Figura 17-	Distribuição dos resultados do teste de IPMC. As amostras com título de ≥1:1280 foram consideradas positivas como determinado pelo índice de Youden, com base nos resultados obtidos no teste de referência (SN)	35
Figura 18-	Curva de ROC com representação área sob a curva (AUC). Fonte: Sergeant, ESG, 2018.	36
Figura 19-	Avaliação da eficiência do teste de IPMC pela estatística de Youden. Fonte: Sergeant, ESG, 2018. Ausvet	37

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Interpretação do índice Kappa	29
Tabela 2-	Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de IPMC e SN das 100 amostras de soro suíno	35

Lista de Anexos

Anexo 1-	PROCESSO Nº 21181.000083/2021-69. INFORMAÇÃO Nº 20/DIFA/CAT/CGSA/DSA/SDA/MAPA. Acordo do LFDA-MG com o projeto de "Verificação de desempenho da técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células para detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A* em amostras de soro de suínos" sob responsabilidade da professora Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes.	6
Anexo 2-	Protocolo código: MET/LDDV/PL/063 – V.3. Detecção de anticorpos para o *Senecavirus A* em amostras de soro pelo ensaio de neutralização viral. Fase: Vigente. Aprovado em: 08/02/2019.	8

Lista de Abreviaturas

aa – aminoácidos

cELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática competitivo

d.p.i. – dias pós-infecção

DVIS – Doença Vesicular Idiopática Suína

ECP – Efeito citopático

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

FMDV – *foot-and-mouth diseases virus*

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral

IFI – imunofluorescência indireta

IFN-γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IHC – Imunohistoquímica

IPMC – imunoperoxidase em monocamada de células

IRES – Sítio interno de entrada dos ribossomos

ISH – hibridização *in situ*

kb – Quilobyte

LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MEM – Meio mínimo essencial

mL – Mililitro

NA – anticorpos neutralizantes

NGS – Sequenciamento de nova geração

nm – Nanômetros

nt – nucleotídeos

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

ORF – Sequência aberta de leitura

pb – pares de base

PBS – Tampão salina fosfato

PCV2 – Circovírus suíno tipo 2

PEDV – vírus da diarreia epidêmica dos suínos

PRNT – neutralização por redução de placas de lise

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

RT-qPCR – Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

SFB - Soro fetal bovino

SN – Soroneutralização viral

SVA – Senecavirus A

SVO – Serviço veterinário oficial

SVV – *Seneca Valley Virus*

UFP/mL – Unidades formadoras de placa / mililitro

URT – Regiões não traduzidas

UVC – luz ultravioleta C

VLP – partículas semelhantes a vírus

µg – micrograma

µL – Microlitro

RESUMO

O *Senecavirus A* (SVA) é um picornavírus emergente relacionado à doença vesicular em suínos jovens e adultos, e a síndrome multissistêmica neonatal em leitões até cinco dias. Surtos da infecção por SVA foram relatados em países como Brasil, Canadá, Estados Unidos e China a partir de 2014. Neste período, foram detectados os primeiros casos de *Senecavirus A* em granjas brasileiras nas regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste. Sendo observadas altas taxas de mortalidade (15 a 30%) em leitões neonatos, além de perda do desempenho de animais em terminação. As lesões vesiculares causadas pelo SVA são clinicamente indistinguíveis das ocasionadas por doenças vesiculares clássicas, como a febre aftosa, cuja notificação é obrigatória. Esse aspecto pode gerar uma série de impactos no comércio de carne suína do país. O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com produção de 4,4 milhões de toneladas em 2020. Diante desse cénário, é necessário o desenvolvimento de testes diagnóstico para monitoramento do patógeno nos rebanhos de suínos. Apesar do método de Imunoperoxidase em Monocamada Celular (IPMC) ser de fácil execução, de poder ser feito em larga escala e de dispensar equipamentos laboratoriais sofisticados ainda não está disponível para detecção de anticorpos contra o SVA. Por isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver o teste de IPMC para SVA e comparar o desempenho desse método em relação ao teste de referência, a soroneutralização (SN). O IPMC foi desenvolvido com base em protocolos dpré-existentes para outros patógenos como o circovírus suíno e o *Vaccinia virus*, e demonstrou capacidade de distinguir resultados positivos e negativos. A comparação e a avaliação do desempenho do teste foram feitas pelo Coeficiente Kappa, e a área sob a curva de ROC associada ao Índice de Youden. As análises estatísticas foram feitas pelo *software Epitools (Sergeant, ESG, 2018. Ausvet)*. A técnica de IPMC apresentou valor de kappa de 0.22, o qual representa concordância razoável (60%) em relação à soroneutralização. As divergências encontradas entre os métodos podem estar correlacionadas com o padrão de resposta imune humoral observada na infecção por SVA, caracterizada por um aumento rápido e robusto de anticorpos neutralizantes fortemente associados à classe IgM, com posterior elevação do isotipo IgG. A SN pode detectar anticorpos neutralizantes de isotipos IgM e IgG e o IPMC padronizado no presente estudo, detecta anticorpos totais do isotipo IgG. Em conclusão, até o momento em populações cujo histórico epidemiológico seja desconhecido, não é recomendado o uso do teste de IPMC como único método de diagnóstico.

Palavras – chave: *Seneca Valley virus*, diagnóstico sorológico, imunoglobulina, doença vesicular, monitoramento soroepidemiológico.

ABSTRACT

Senecavirus A (SVA) is an emerging picornavirus related to vesicular disease in young and adult pigs, and neonatal multisystem syndrome in piglets up to five days old. Outbreaks of SVA infection have been reported in countries such as Brazil, Canada, the United States and China since 2014. During this period, the first cases of *Senecavirus A* were detected on Brazilian farms in the Southeast, South and Midwest regions. High mortality rates (15 to 30%) were observed in newborn piglets, in addition to loss of performance in finishing animals. The vesicular lesions caused by SVA are clinically indistinguishable from those caused by classic vesicular diseases, such as foot-and-mouth disease, whose notification is mandatory. This aspect can generate a series of impacts on the country's pork trade. Brazil is the fourth largest producer of pork in the world, with production of 4.4 million tons in 2020. Given this scenario, it is necessary to develop diagnostic tests to monitor the pathogen in swine herds. Although the Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) method is easy to perform, can be performed on a large scale and does not require sophisticated laboratory equipment, it is not yet available for detection of antibodies against SVA. Therefore, the aim of this study was to develop the IPMC test for SVA and compare the performance of this method in relation to the reference test, serum neutralization (SN). The IPMA was developed based on pre-existing IPMC protocols for other pathogens such as *Porcine circovirus* and *Vaccinia virus* and has demonstrated the ability to distinguish positive and negative results. The test performance was compared and evaluated using the Kappa coefficient, and the area under the ROC curve was associated with the Youden Index. Statistical analyzes were performed using Epitools software (Sergeant, ESG, 2018. Ausvet). The IPMC technique presented a kappa value of 0.22, which represents reasonable agreement (60%) in relation to serum neutralization. The differences found between the methods may be correlated with the pattern of humoral immune response observed in SVA infection, characterized by a rapid and robust increase in neutralizing antibodies strongly associated with the IgM class, with subsequent elevation of the IgG isotype. The SN test can detect neutralizing antibodies of IgM and IgG isotypes while the IPMC standardized in the present study detects total antibodies of the IgG isotype. In conclusion, in populations with an unknown epidemiological history, the use of the IPMC test as the sole diagnostic method is not recommended.
Key – words: *Seneca Valley virus,* serological diagnosis, immunoglobulin, vesicular disease, seroepidemiological monitoring.

1. INTRODUÇÃO

O *Senecavirus A* (SVA) é único representante do gênero *Senecavirus*, pertencente à família *Picornaviridae* (ICTV, 2021) e foi descoberto acidentalmente, em culturas de células PER.C6 contaminadas com o agente, no ano de 2002, em Maryland, EUA (Knowles *et al*., 2006). Pouco tempo depois, Pasma *et al.* (2008) relataram um surto de Doença Vesicular Idiopática Suína (DVIS) em animais transportados do Canadá, cujas lesões eram indistinguíveis das ocasionadas pelos agentes virais responsáveis pelas infecções vesiculares clássicas, como Febre Aftosa, Estomatite Vesicular, Doença Vesicular do Suíno e Exantema Vesicular dos Suínos. Entretanto, as amostras biológicas coletadas foram negativas no teste de RT-PCR para os agentes vesiculares clássicos, tendo sido detectado o RNA do SVA.

Desde 2014, surtos de doença vesicular em suínos associada ao SVA vêm sendo relatados em países como Brasil, Estados Unidos, China, Tailândia, Colômbia e Vietnã (Leme *et al*., 2015, Hause *et al*., 2016, Wu *et al*., 2017, Saeng-Chuto *et al*., 2018, Sun *et al*., 2017, Arzt *et al*., 2019). Neste período, foram detectados os primeiros casos de *Senecavirus A* em granjas nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais. A doença pode acometer todas as categorias de produção, e os animais geralmente apresentam lesões vesiculares e ulcerativas no focinho, na cavidade oral, na banda coronária e outras regiões dos cascos. Em animais adultos foi verificada a ocorrência de dificuldade de locomoção e, consequentemente, redução no consumo de ração e no ganho de peso diário. Foram demonstradas altas taxas de mortalidade (15-30%) entre leitões com até cinco dias de idade (Leme *et al*., 2015; Maggioli *et al*., 2017).

Aspectos relacionados à epidemiologia e a patogenia da doença ainda precisam ser elucidados. No entanto, Joshi *et al*. (2016a) demonstraram que o SVA pode ser eliminado nas secreções nasais, orais e nas fezes por até vinte e oito dias pós-infecção, sendo a contaminação ambiental uma possível rota de transmissão do agente. Além disso, o mesmo estudo mostra que provavelmente a principal forma de disseminação do vírus se dá pelo contato direto entre animais doentes com animais susceptíveis, diante da alta carga viral presente nas amostras de fluído vesicular.

O Brasil tem um papel importante na produção mundial de suínos, sendo hoje o quarto produtor e exportador mundial de carne suína (EMBRAPA, 2021). Os prejuízos causados pela infecção por SVA relacionados à perda de desempenho dos animais e mortalidade dos leitões, bem como o fato de ser uma enfermidade clinicamente indistinguível de outras doenças vesiculares de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Leme *et al*., 2015), podem gerar barreiras comerciais e sanitárias interferindo no mercado internacional de suínos e também

de bovinos. De acordo com o Manual de Investigação de Doença Vesicular (BRASIL, 2020), a identificação de casos suspeitos de doença vesicular em estabelecimentos de abate de animais susceptíveis a febre aftosa acarreta a suspensão imediata da saída dos produtos obtidos do abate do dia em que foi constatado o caso provável.

Por isso, testes diagnósticos que permitam a rápida identificação e o monitoramento do agente são ferramentas importantes para que seja feita a vigilância epidemiológica nas granjas. A realização de estudos sorológicos retrospectivos e prospectivos possibilita caracterizar o perfil sanitário dos rebanhos, bem como determinar os fatores de risco relacionados à infecção e verificar a eficiência da adoção de medidas de controle (Saporiti *et al.,* 2017).

O ensaio de imunoabsorção enzimática competitivo (cELISA) e a soroneutralização (SN) são os testes frequentemente utilizados para detecção de anticorpos contra SVA (Goolia *et al*., 2017). No entanto, são métodos com desenvolvimento laborioso e de elevado custo. Até o momento não existem testes de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) para detecção do *Senecavirus*. Estudos mostram que o IPMC é uma importante alternativa para o diagnóstico indireto de doenças infecciosas como a varíola bovina, a circovirose suína, peste suína africana e também arboviroses em humanos. Este método possui aspectos positivos por ser de fácil execução, não exigir estrutura laboratorial muito sofisticada, e por poder ser utilizado em larga escala, pois as placas podem ser previamente preparadas e congeladas por até três meses. Além disso, a técnica de IPMC dispensa o pré-tratamento (56°C/30min) dos soros antes da realização do exame, podendo também ser facilmente adaptada para detecção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, como IgM e IgG, apenas com a alteração do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Soliman *et al*., 1997; Direksin *et al*., 2002; Gerber *et al*., 2012; Gallardo *et al*., 2015).

Gerber *et al.* (2012) fizeram a comparação entre o IPMC e a técnica de referência, o teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) para detecção de anticorpos contra o vírus da vaccínia bovina, e demonstraram que o IPMC foi capaz de detectar anticorpos totais 17 dias antes da detecção de anticorpos neutralizantes pelo PRNT, além de permitir a detecção das imunoglobulinas por um período de tempo maior que o teste padrão, em animais naturalmente infectados. Soliman *et al*. (1997), relataram que testes de IPMC para detecção de anticorpos contra os vírus da febre do Vale do Rift e da febre do Nilo Ocidental apresentaram sensibilidade de 96% e 91% respectivamente, e especificidade de 100%. Diante disso o desenvolvimento da técnica de IPMC para detecção de anticorpos contra o SVA se torna promissor, por ser um teste rápido e que pode ser executado fora do fluxo laminar. E dessa forma, permitir maior agilidade no acompanhamento soroepidemiológico dos rebanhos de suínos do país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver os testes de soroneutralização (SN) e de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) para detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A* em amostras de soro de suínos, para comparar o desempenho entre os métodos, utilizando a SN como teste de referência, de modo que a técnica de IPMC possa ser estabelecida como novo método de diagnóstico sorológico e de monitoramento soroepidemiológico do SVA nas granjas brasileiras.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver a técnica de soroneutralização utilizando as linhagens de células de carcinoma pulmonar humano (NCI-H1299) para detecção de anticorpos neutralizantes contra o SVA;
- Desenvolver a técnica de IPMC com as linhagens de células NCI-H1299 para detecção de anticorpos totais contra SVA;
- Avaliar o desempenho da técnica de IPMC em relação à soroneutralização em amostras de soro controle e amostras de soro teste provenientes de granjas, nas quais tenha ocorrido surto de *Senecavirus A*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação e Morfologia do *Senecavirus A*

Os picornavírus têm demonstrado um papel relevante na história da medicina humana e veterinária. Classificada em 68 gêneros diferentes, a família *Picornaviridae* é considerada uma das mais diversificadas famílias virais. Esse grupo é composto por vírus pequenos com cerca de 25 a 30 nm de diâmetro, de capsídeo icosaédrico, que não possuem envelope lipídico (Figura 1) e que apresentam genoma RNA linear de fita simples e de polaridade positiva, com 7 a 8,5kb. Os picornavírus são agentes causadores de importantes doenças em animais e em humanos. Dentre as principais enfermidades na medicina veterinária podem ser citadas a Febre Aftosa, a Doença Vesicular de Suínos, a Encefalomiocardite dos camundongos, Perdas Neonatais Epidêmicas Transientes (PNET) e Doença Vesicular associada à infecção por *Senecavirus A*, que ocasionam grande impacto na cadeia produtiva das espécies acometidas (MacLachlan, 2011; Flores, 2017; Gorbalenya *et al.*, 2020).

Para ser classificado como um membro da família *Picornaviridae*, o vírus deve possuir um conjunto básico de características como a mesma estrutura do sítio interno de entrada dos ribossomos (*internal ribossomal entry site* – IRES), homologia nos peptídeos *Leader*, 2A, 2B e 3A, além de correspondência mínima de 40% entre a sequência de aminoácidos das regiões P1, P2 e P3. Outro traço típico dos picornavírus é o genoma que contém uma única e longa sequência aberta de leitura (*open reading frame* – ORF), cuja tradução resulta em uma poliproteína precursora de proteínas estruturais e não estruturais, que pode ser dividida em

três regiões: P1 que dá origem as proteínas do capsídeo; P2 e P3 que geram proteínas não estruturais, responsáveis pela replicação viral (Flores, 2017; Gorbalenya *et al.*, 2020).

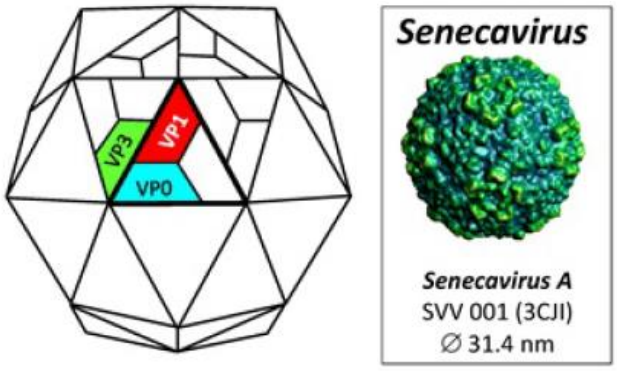

Figura 1 – A: Esquema do capsídeo viral de formato icosaédrico dos picornavírus, ilustrando o protômero composto pelas proteínas VP1, VP3 e VP0 (clivada em VP2 e VP4 – compõe a região interna do capsídeo). B: Representação da estrutura dos picornavírus. Fonte: ICTV, 2020.

O *Senecavirus A* (SVA), anteriormente, nomeado como *Seneca Valley virus* (SVV) é o único representante do gênero *Senecavirus*, pertencente à família *Picornaviridae* (ICTV, 2021). Esse vírus foi descoberto acidentalmente, em 2002, durante o cultivo de células PER.C6, contaminadas com o agente viral, em Maryland, nos EUA. Há suspeita que o vírus tenha sido introduzido no cultivo celular por meio de insumos, como a tripsina suína contaminada com SVA (Knowles *et al*., 2006). Mas somente em 2008, Pasma e colaboradores relataram um surto de Doença Vesicular Idiopática Suína (DVIS) em animais transportados do Canadá associada à infecção por SVA, no qual foram observadas lesões clinicamente indistinguíveis das ocasionadas pelos agentes virais responsáveis pelas doenças vesiculares clássicas.

A partir desse momento, foram feitos estudos demonstrando a sequência completa do genoma do *Senecavirus A*, provando que o vírus possui genoma típico dos picornavírus, com o padrão *Leader* – 4 polipeptídeos da P1 – 3 polipeptídeos da P2 – e 4 polipeptídeos da P3 (L-4-3-4) (Figura 2). O RNA linear de fita simples do SVA é composto por aproximadamente, 7.300 de nucleotídeos (nt), flanqueada por duas regiões não traduzidas (*untranslated region* – UTR) de 666 nt na extremidade 5’ e de 71 nt na 3’, com cauda poli (A). Assim como os demais membros dessa família, o genoma do SVA contém uma única e longa região ORF originando uma extensa poliproteína, com cerca de 2180 aminoácidos (aa) (Hales *et al*., 2008).

Após a tradução essa poliproteína é clivada por uma protease, resultando em 11 proteínas virais (Figura 2). A região P1 é codificada nos polipeptídeos estruturais VP0, VP3 e VP1, que constituem o capsídeo viral, e em seguida, ao processo de maturação a VP0 origina as proteínas VP2 e VP4, essa última compõe a parte interna do capsídeo. As regiões genômicas P2 e P3 codificam polipeptídeos não estruturais envolvidos no processamento de

proteínas (2A^{pro}, 3C^{pro} e 3CD^{pro}) e também as associadas à replicação viral (2B, 2C, 3AB, 3BVPg, 3CD^{pro} e 3D^{pol}). A região P2 é dividida em três seções: 2A composta por 9 aa e finalizada por uma região conservada NPG↓P cuja função está relacionada a indução de "salto" ribossomal; 2B cuja sequência primária difere os outros picornavírus conhecidos. No entanto, as estruturas secundárias das proteínas 2B de picornavírus são semelhantes entre si e provavelmente, desempenham um papel no aumento da permeabilidade da membrana, agindo como uma virosporina; 2C é um polipeptídeo semelhante à helicase envolvido na síntese de RNA. Já, a região P3 é composta por quatro segmentos: 3A cuja função não é conhecida; 3B codifica uma proteína VPg que atua como um iniciador para a síntese de RNA viral; 3C que atua como proteinase e 3D principal componente da RNA polimerase dependente de RNA (Hales *et al.*, 2008; Racaniello, 2007).

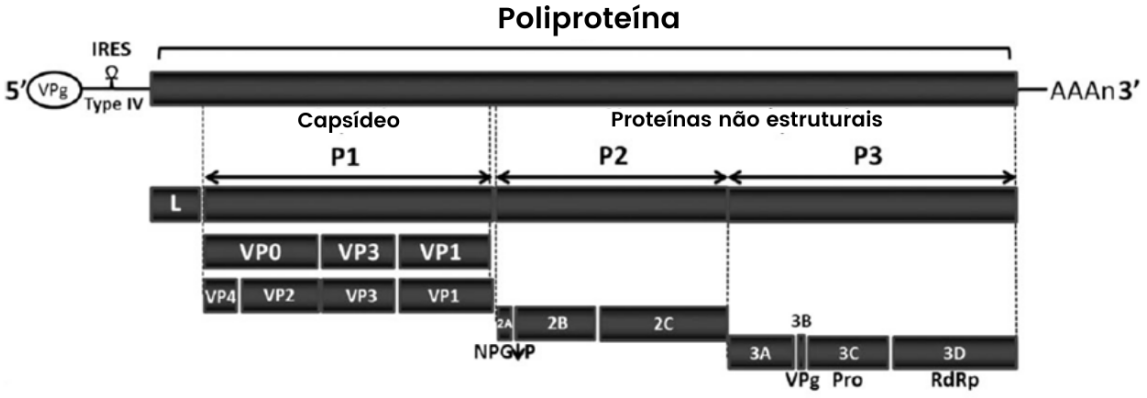

Figura 2 – Representação esquemática do genoma do *Senecavirus A.*
Fonte: Adaptado de Segalés *et al*., 2017.

Estudos feitos por Hales *et al*., 2008 estabeleceram comparações entre o genoma do SVA e o de outros picornavírus, e demonstraram que os polipeptídeos P1, 2C, 3C e 3D do *Senecavirus A* estavam mais relacionados aos dos cardiovírus, enquanto outras regiões diferiam consideravelmente de todos os outros membros da família. Além disso, as proteínas não estruturais 2C, 3C e 3D, que são regiões consideradas relativamente conservadas em picornavírus, o SVA demonstrou também estar mais relacionado aos do gênero *Cardiovirus*. Assim como os outros vírus da família *Picornaviridae*, as sequências dos resíduos de aminoácidos dos sítios ativos e do *motif* das proteínas 3C e 3D do SVA também são conservadas. No entanto, apesar de existirem semelhanças foram também notadas diferenças significativas entre outras regiões genômicas do SVA e os Cardiovirus e até mesmo entre outros picornavírus, como, por exemplo, o IRES do SVA que é do tipo IV e as regiões 2A, 2B, 3A e 3B que diferem consideravelmente entre esses vírus. Em vista disso, o *Senecavirus A* foi classificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) como uma

nova espécie dentro de um novo gênero da família *Picornaviridae* (Hales *et al*., 2008; Willcocks *et al*., 2011).

3.2 Ciclo de Replicação do SVA

O ciclo de replicação dos picornavírus se inicia com a interação dos vírions com os receptores celulares, que estão relacionados ao tropismo tecidual, tendo uma influência fundamental na patogenia da doença (Flores, 2017). Como o SVA é conhecido por ter como alvo células com características tumorais neuroendócrinas possivelmente, o tropismo celular desse vírus está direcionado pela ligação a receptores expressos em tais células. Em testes *in vitro* para verificação da interação do SVA com linhagens celulares de tumor humano foi identificado o receptor 1 da toxina do antraz (ANTRX1), também conhecido como marcador endotelial tumoral 8 (TEM8), considerado essencial para fixação e desnudamento do vírus nessas células (Miles *et al*., 2017; Cao *et al.,* 2018). No entanto, ainda são necessários estudos para avaliar a participação desta molécula para a infecção do SVA em suínos.

Trabalhos relacionados à estrutura do *Senecavirus A* demonstraram que o agente apresenta o *motif* DGK exposto na superfície do capsídeo viral, localizado no *canyon* formado pelos *loops* VP1/2 e o *puff* de VP2. Dessa forma, é provável que o *motif* DGK possa desempenhar um papel importante no reconhecimento dos receptores de integrina nas superfícies das células. Além de haver indícios que o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) possa ser outro local de ligação do SVA (Venkataraman *et al*., 2008).

Após essa interação alguns picornavírus serão internalizados por endocitose, como o *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) e outros, como os poliovírus, por meio da ejeção do RNA viral para o interior da célula por poros na membrana celular provocados pela proteína VP1 (MacLachlan, 2011). Estudos com SVA demostram que o vírus utiliza o TEM8 como uma glicoproteína transmembrana para facilitar a entrada na célula, no entanto esse mecanismo ainda não foi bem estabelecido *in vivo* (Evans *et al*., 2018).

A replicação dos picornavírus ocorre inteiramente no citoplasma das células hospedeiras. Após adsorção, desnudamento e liberação no citoplasma, ocorre a tradução do RNA viral diretamente pelos polirribossomos. Os picornavírus possuem um mecanismo de iniciação da síntese de proteínas independente de *Cap,* composto pelos sítios internos de entrada dos ribossomos (IRES) capazes de formar uma estrutura secundária complexa que serve de sítio de ligação para ribossomos e os direciona ao códon de iniciação da tradução. A ORF é traduzida em uma única poliproteína, clivada em precursores P1, P2 e P3, e em seguida, origina as proteínas individuais. (Flores, 2017) (Figura 3). Entre as proteínas sintetizadas estão a RNA polimerase dependente de RNA viral e proteínas acessórias necessárias para a replicação do genoma e síntese de mRNA (Racaniello, 2007).

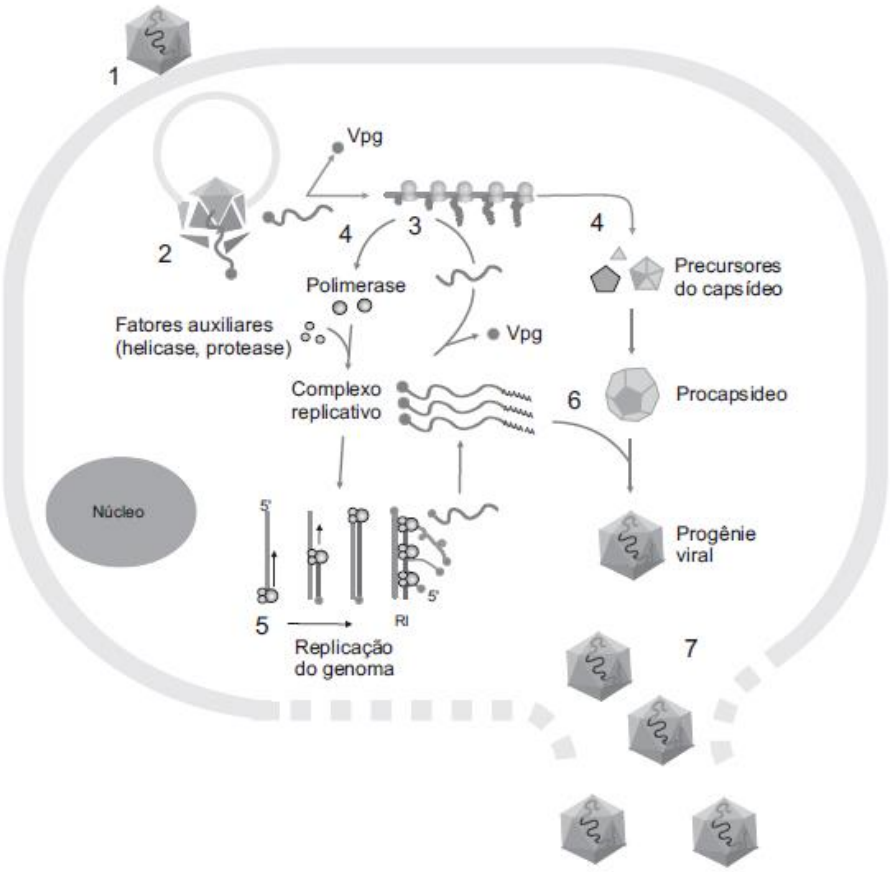

Figura 3 – Esquema do ciclo de replicação da família *Picornaviridae.* 1. Ligação aos receptores celulares; 2. Penetração e desnudamento; 3. Tradução do RNA no sentido positivo; 4. Clivagem dos precursores das proteínas; 5. Replicação do genoma via produção de um RNA antigenômico; 6. Morfogênese; 7. Liberação das partículas virais por lise celular. Fonte: Adaptado de Flores, 2017.

A replicação do material genético ocorre após alguns ciclos de tradução e maturação de proteínas (Flores, 2017). A primeira etapa na replicação consiste na síntese de uma cópia do RNA de sentido genômico para formar um intermediário de RNA antigenômico, e em seguida, iniciar produção de cópias de RNA no sentido positivo. Esses eventos ocorrem em pequenas vesículas membranosas que são induzidas por várias proteínas virais. Uma vez que o pool de proteínas do capsídeo é suficientemente grande, a encapsidação começa. O RNA genômico recentemente sintetizado se associa a pentâmeros para formar o vírus infeccioso. Os capsídeos vazios encontrados nas células infectadas são provavelmente uma forma de armazenamento de pentâmeros. A cinética de replicação dos picornavírus é rápida, sendo necessário para completar um único ciclo de 5 a 10 horas, dependendo de muitas variáveis, incluindo o vírus específico, temperatura, pH, célula hospedeira e multiplicidade de infecção. Muitos picornavírus são liberados por meio de lise celular, após perda de integridade da membrana (Racaniello, 2007).

3.3 Epidemiologia do *Senecavirus A*

No período entre 2002 e 2014, foram relatados poucos casos de doença vesicular relacionada à infecção por SVA em suínos, no Canadá e nos EUA. No entanto, estudos moleculares retrospectivos demonstraram que o agente já circulava nas granjas estadunidenses desde 1988 (Knowles, *et al*., 2006). Apesar disso, somente a partir do final de 2014, é que foram relatados surtos de doença causada pelo SVA em suínos nos seguintes países (Figura 4): Canadá, Estados Unidos, Brasil, Colômbia, China, Tailândia e Vietnã (Leme *et al*., 2015, Hause *et al*., 2016, Wu *et al*., 2017, Saeng-Chuto *et al*., 2018, Sun *et al*., 2017, Arzt *et al*., 2019). Nesta época, foram detectados os primeiros casos de *Senecavirus A* em granjas brasileiras nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (sul), Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (centro-oeste), São Paulo e Minas Gerais (sudeste) (Figura 4). Essas três regiões geográficas concentram 95% da produção nacional de carne suína do país (ABPA, 2020).

Knowles *et al*., 2006 detectaram títulos de anticorpos neutralizantes (AN) contra o SVA de 1:4 e 1:8 em suínos e bovinos, respectivamente. A identificação de AN sugere que houve exposição ao *Senecavirus A* em quantidade e de forma suficiente para induzir uma resposta imunológica mensurável nessas espécies domésticas. Do mesmo modo, pesquisas anteriores demonstraram a presença de AN em suínos, que foram indicados como hospedeiros naturais do *Senecavirus* (Knowles&Hallenbeck, 2005) Sinais clínicos relacionados à infecção por SVA foram observados apenas em porcos, não tendo sido investigado o papel dos ruminantes domésticos na epidemiologia da doença até o momento (Knowles *et al*., 2006; Joshi *et al*., 2016b). Dessa forma, atualmente, os suínos são considerados hospedeiros do *Senecavirus A*. Além disso, esse agente foi isolado de amostras de fezes e de intestino delgado de camundongos, dados que corroboram os estudos de Knowles e colaboradores (2006) que detectaram anticorpos específicos contra o SVA nesses animais. (Joshi *et al*., 2016b). O RNA viral foi também detectado em moscas domésticas coletadas em fazendas afetadas pelo agente, apesar disso ainda não foram realizados estudos para investigar a função de camundongos e moscas na disseminação da doença, ou seja, se poderiam atuar como possíveis reservatórios ou vetores mecânicos do SVA. Ainda não há indícios de que o SVA possa infectar seres humanos (Knowles *et al*. 2006; Joshi *et al*., 2016b).

Dados de soroprevalência do SVA, no mundo, permanecem escassos. Houston e colaboradores (2019) detectaram anticorpos contra SVA em granjas, nos EUA, que não apresentavam sinais clínicos da doença durante a coleta. Neste estudo foi obtida prevalência em nível de rebanho de 42,7% e 75,8% em unidades de terminação e em granjas de reprodutores, respectivamente. No total foram testadas 219 propriedades localizadas em 18 estados norte-americanos diferentes. Trabalhos existentes, na China, detectaram infecção por SVA em mais da metade das províncias chinesas (Zhang *et al.*, 2019).

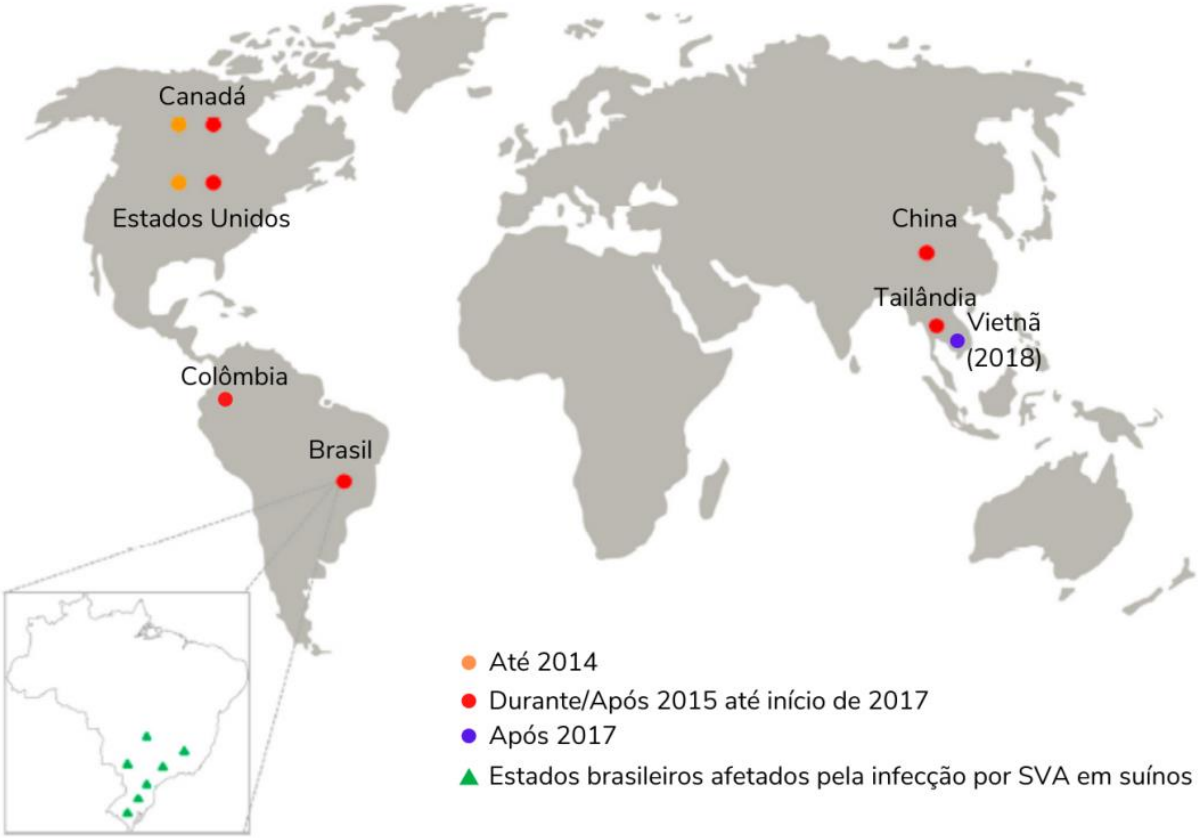

Figura 4 – Distribuição mundial do *Senecavirus A* de 1988 até 2018.
Fonte: Adaptado de Leme *et al*., 2017.

No Brasil, não existem estudos recentes acerca da situação soroepidemiológica do SVA nas propriedades. No entanto, no segundo semestre de 2018, novos surtos de doença vesicular foram relatados em rebanhos de suínos da região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás) brasileiros, principalmente em suínos em terminação (Leme *et al*., 2019). Neste período, foi realizada uma pesquisa para diagnóstico diferencial entre SVA e FMDV em unidades de terminação, no estado de MG, e as taxas de morbidade e mortalidade obtidas foram de 20% e 2,2%, respectivamente (Muller *et al*., 2020).

As taxas de mortalidade e morbidade variam de acordo com a categoria afetada. Durante os surtos de SVA, em 2015, as taxas de morbidade e mortalidade eram significativamente maiores em leitões recém-nascidos até cinco dias de vida, com valores de morbidade que atingiam até 70%, e taxas de mortalidade que variavam de 15 a 30%. Entretanto, esses índices retornavam à normalidade após duas a três semanas no rebanho afetado. Foram observadas também as taxas de morbidade entre 0,5 a 5% em leitões de creche e 5 a 30% em animais de terminação e reprodutores (Leme *et al*. 2015; Leme *et al*., 2016). Esses valores variavam de acordo com a região geográfica e a origem do rebanho. Apesar dos índices de morbidade consideravelmente, mais altos relatados em matrizes,

podendo atingir de 70 a 90%, a mortalidade nestas categorias era muito baixa (0,2%), ocorrendo à recuperação dos animais após a resolução dos sinais clínicos que duravam aproximadamente, 15 dias (Leme *et al*., 2016; Gimenez-Lirola *et al*., 2016; (Baker *et al*., 2017).

A principal forma de transmissão do SVA é o contato direto entre animais susceptíveis e animais doentes, uma vez que foi detectada uma alta carga viral presente nas amostras de fluído vesicular, com cerca de $2x10^7$ a $1,2x10^{11}$ cópias genômicas/mL. Estudos de patogenia mostram que a inoculação intranasal de animais de terminação com elevada quantidade do vírus ($10^{7.5}$ $TCID_{50}$ mL^{-1}) provoca a doença nesta faixa etária (Guo *et al*., 2016; Joshi *et al.,* 2016a). Além disso, no intuito de investigar possíveis rotas de disseminação do SVA, um grupo de pesquisadores introduziu leitões sadios de 28 dias de idade, em baias contendo leitões de mesma idade infectados por SVA, e foram observados sinais clínicos semelhantes nesses animais sentinelas (Liu *et al*., 2021).

Pesquisas recentes evidenciam a possibilidade de existir animais portadores do SVA, que atuam como importantes fontes de infecção para os susceptíveis na granja. Neste estudo, matrizes inoculadas via intranasal com o SVA apresentaram altos níveis de ácido nucleico do vírus nas tonsilas até 60 dias pós-infecção. Também foi detectado o RNA do *Senecavirus* em amostras de suabe oral, fecal e nas tonsilas de leitões recém-nascidos mantidos com as mães consideradas portadoras do SVA. Este resultado demonstra a capacidade dessas matrizes de albergar o vírus possivelmente, nas tonsilas e de transmitir esse agente aos leitões (Maggioli *et al*., 2019).

Existem também indícios de que o SVA possa ser transmitido verticalmente, pois o vírus foi detectado por RT-PCR e ensaios imunohistoquímicos em diferentes amostras de tecidos e órgãos de leitões de um a dois dias de idade. No entanto, mais estudos têm de ser realizados para investigar essa hipótese (Leme *et al*., 2016). Além disso, Sturos *et al*., 2017 detectaram RNA do SVA em amostras de sêmen de reprodutores experimentalmente e naturalmente infectados, com valores de Ct "*Cycle Threshold*" variando entre 20 a 34. Três meses após o surto, os reprodutores com infecção natural foram eutanasiados e o RNA viral foi detectado nos testículos desses animais. Adicionalmente, na avaliação histológica foi visto orquite linfocítica intersticial e degeneração dos túbulos seminíferos. Esses resultados sugerem que o sêmen possa ser uma fonte de infecção para fêmeas susceptíveis (Sturos *et al*., 2017).

Outra importante rota de disseminação do SVA é a contaminação ambiental, pois geralmente, vírus não envelopados apresentam maior resistência no ambiente (Sattar, 2007). Joshi e colaboradores (2016a) relataram que o SVA pode ser eliminado nas secreções nasais, orais e nas fezes por até 28 dias pós-infecção, ou seja, mesmo após a resolução dos sinais clínicos. Este mesmo grupo conseguiu detectar partículas virais viáveis a partir de amostras ambientais coletadas em granjas afetadas e não afetadas, como em veículos de transporte

de animais, no chão ao redor da fazenda, na poeira dos exaustores e nas fezes de camundongos (Joshi *et al*., 2016b), evidenciando a probabilidade de transmissão SVA por fômites. Além disso, estudos de avaliação da estabilidade do SVA em ingredientes da ração demonstraram que o vírus tem meia-vida de 9,8 e 25,6 dias em farelo de soja e em grãos secos de destilaria, respectivamente, quando mantidos a 4°C (Caserta *et al*., 2021).

Os vírus da família *Picornaviridae* geralmente são resistentes ao éter, clorofórmio e álcool, porém são inativados rapidamente, por meio do uso da radiação iônica, do fenol e dos formaldeídos (Flores, 2017; Gorbalenya *et al*., 2020). Foram realizados testes para medir a capacidade de inativação do SVA pela luz ultravioleta C (UVC) em amostras de tecido, plástico e papelão. Mas não houve redução significativa do título viral nas superfícies de papelão e tecido contendo PBS ou fezes e em plástico com fezes. O que corrobora com outros estudos que mostraram menor eficácia da luz UVC em superfícies porosas e irregulares, pois a irregularidade pode proteger o vírus da luz. Além disso, matéria orgânica, como fezes também podem proteger e bloquear a ação da luz UVC sobre o patógeno, diminuindo sua eficácia como desinfetante (Ruston *et al*., 2019).

Singh *et al.* (2017) demonstraram que o hipoclorito de sódio (5.25%) diluído em 1:20 foi eficaz na inativação de SVA em superfícies como alumínio, borracha, cimento, plástico e aço inoxidável, eliminando 99,9% do vírus após 15 minutos de contato a 4°C e a 25 °C. Neste estudo compostos a base de fenol não foram eficientes na eliminação total do patógeno, mesmo após 60 minutos em contato com a superfície, diferentemente, do que é notado em outros picornavírus que são sensíveis ao fenol. O quaternário de amônio (26%) associado ao glutaraldeído (7%) diluído 1:256 foi capaz de inativar o SVA somente após uma hora de ação. Produtos comerciais à base de peróxido de hidrogênio (1:20) e monopersulfato de potássio (1%) também se mostraram eficazes contra o SVA após tempo de ação de dez minutos (Hole *et al*., 2017).

3.4 Epidemiologia Molecular do *Senecavirus A*

Desde a descoberta do *Senecavirus A* em 2002, e a associação desse agente com a Doença Vesicular Idiopática em Suínos (DVIS) em 2008 (Pasma *et al*., 2008), várias sequências genômicas parciais e completas do SVA foram depositadas no GenBank. Até o momento, estão disponíveis 442 sequências dos diferentes países nos quais foram identificados surtos da infecção pelo SVA, desde 2014 (disponível em Genbank, jan/2022). Este aumento na disponibilidade de dados acerca do genoma do vírus constitui-se como um fator que permitiu avanços nos estudos da epidemiologia molecular desse agente.

Leme *et al*., (2017) observaram que sequências totais e parciais de *Senecavirus A* de diferentes países, disponíveis entre os surtos de 2015 e 2016, apresentaram alta similaridade de nucleotídeos (nt) (95,8 a 99,9%) entre si. No entanto, demonstraram menor semelhança

de nt (93,8 a 94,6%) com o SVA de referência, denominado SVV-001/2002. Sendo notado que apenas um isolado canadense 11-55910-3 (número de acesso GenBank KC667560) apresentava maior identidade (95%) com o SVV-001 e (96–98,2%) com amostras contemporâneas de *Senecavirus* (2015-2016). Com base na comparação nas sequências da região VP1 do capsídeo viral, os isolados de SVA foram agrupados em três clados temporais diferentes (Figura 5), bem como observado por Joshi *et al.,* 2016.

O clado I inclui as amostras inicialmente identificadas, como o SVV-001 de referência, o clado II os *Senecavirus* identificados nos EUA no banco de amostras de 1988 e 1997 e o clado III que contém os vírus contemporâneos detectados nos surtos no Brasil, Canadá, China, Tailândia e EUA identificadas entre 2001 e 2016 (Figura 5). Além disso, podem ser observados agrupamentos geográficos dentro do clado III, visto que os diferentes isolados de SVA se associam de acordo com o país de origem (Leme *et al*., 2017; Segalés *et al*., 2017).

Fernandes *et al*. (2018) curiosamente relataram que suínos de 15 semanas de idade inoculados com o vírus SVV-001 histórico não apresentaram sinais de doença vesicular. No entanto, foi observada soroconversão e uma baixa viremia nesses animais, sendo também detectada a eliminação do vírus em amostras de suabe nasal, oral e retal. Diferentemente, os porcos que foram infectados com isolado SD15-26 contemporâneo apresentaram doença clínica, com aparecimento de lesões vesiculares no focinho e nos cascos. Esses resultados sugerem que o SVV-001 possivelmente, é menos virulento em comparação com amostras contemporâneas.

Neste estudo de comparação entre SVA SVV 001 e o isolado SVA contemporâneo foram notadas várias alterações de nucleotídeos envolvendo as regiões da ORF e da UTRs 5' e 3'. No entanto, ainda não é possível afirmar que as mudanças genéticas observadas no SVA contemporâneo sejam responsáveis pelo aumento da virulência do vírus (Fernandes *et al.*, 2018). Apesar das diferenças observadas no genoma dos isolados de *Senecavirus A*, estudos demonstram que ocorre neutralização cruzada entre os vírus, sugerindo que exista apenas um sorotipo de SVA (Buckley et al., 2021).

Nascimento-Laguardia e colaboradores (2016) analisaram sequências parciais brasileiras de *Senecavirus A* coletados de janeiro a agosto de 2015, nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Santa Catarina, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul, e observaram que as amostras nacionais eram semelhantes às identificadas nos EUA em 2015. E ao serem comparados pela região da proteína VP1, esses isolados apresentaram maior similaridade com regiões do genoma de amostras de SVA canadenses (2011) do que com as estadunidenses de 1988 a 1997. Foi então proposto que esses vírus tenham uma origem genética em comum, uma vez que todos os isolados brasileiros se encontram agrupados em um mesmo clado.

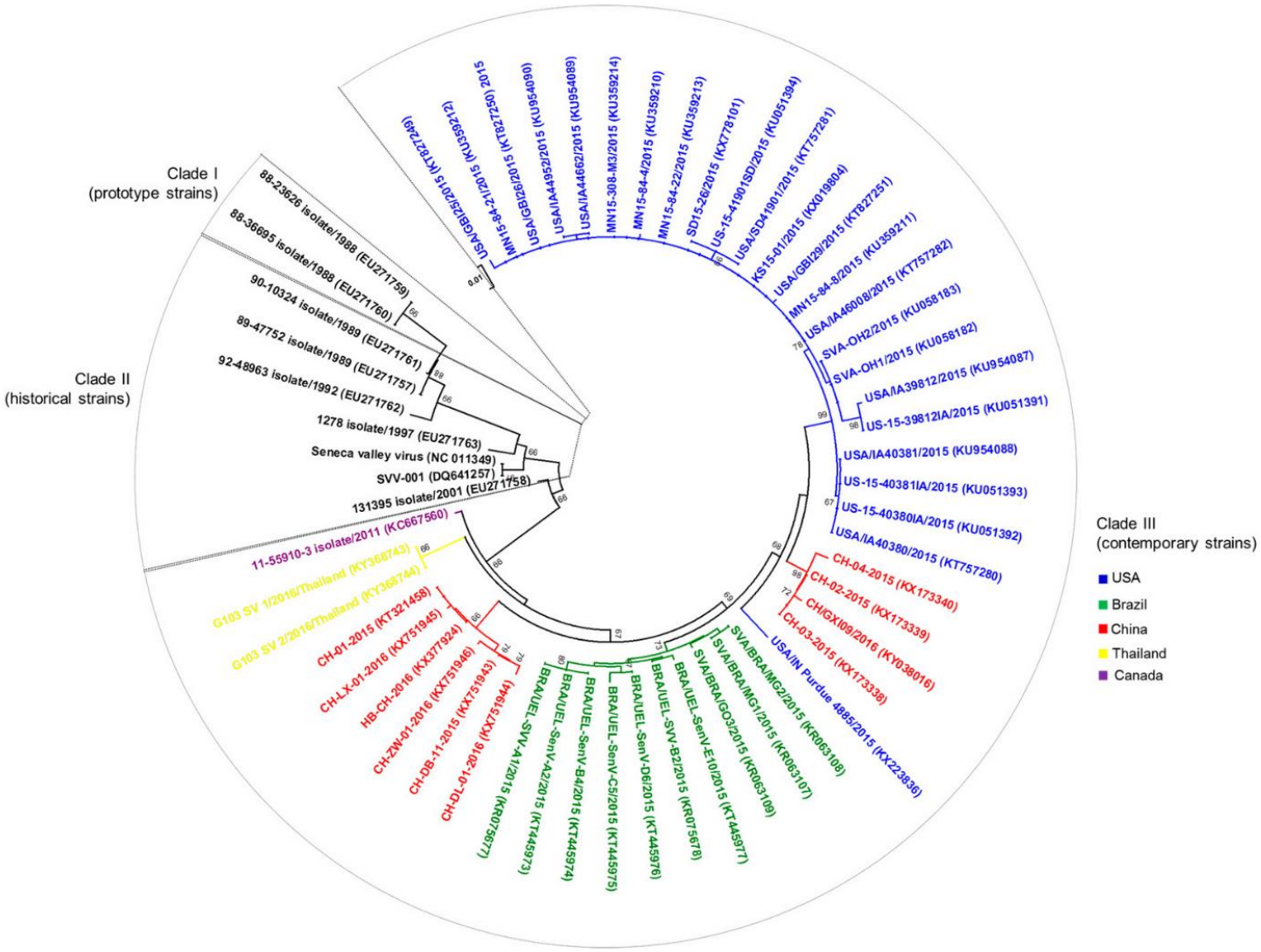

Figura 5 – Relações evolutivas dos isolados de *Senecavirus A* identificadas nos EUA, Canadá, Brasil, China e Tailândia entre 1988 e 2016. A Árvore filogenética foi construída com base em 56 sequências nucleotídicas parciais (541 pb) da região VP1 (capsídeo viral) do genoma do *Senecavirus*. Fonte: Leme *et al*., 2017.

3.5 Patogenia da Infecção por SVA

O *Senecavirus* induz uma doença vesicular aguda e autolimitada em suínos adultos e em terminação, que é clinicamente indistinguível das lesões causadas por agentes vesiculares clássicos, como Febre Aftosa e Estomatite Vesicular. Os sinais clínicos são vistos após um curto período de incubação de cerca de três a cinco dias. Estudos sugerem que as tonsilas são os possíveis sítios de replicação primária do *Senecavirus* durante a fase aguda da infecção. Há essa hipótese, uma vez que foram detectadas altas concentrações de RNA viral nesse local, bem como foram demonstradas evidências de que há replicação do SVA no epitélio que reveste as criptas tonsilares por meio da demarcação do ácido nucleico do vírus em testes de hibridização *in situ*. Além disso, foi observado que a infecção pelo SVA é caracterizada por uma viremia de curta duração, entre um a dez dias (Joshi *et al*., 2016a; Maggioli *et al.,* 2018).

Trabalhos de patogenia em animais de terminação demonstraram que a inoculação oronasal do SVA causa inicialmente, letargia e claudicação, associada à laminite que observadas no 4° dia pós-infecção (d.p.i.). Logo depois, são notadas vesículas nos lábios, no focinho e nos cascos principalmente, na banda coronária (Figura 6) e nos espaços interdigitais desses animais (Joshi *et al*., 2016a; Maggioli *et al.,* 2018). A princípio ocorre à formação de eritema na pele, que progride e se desenvolve nas lesões vesiculares. Depois essas estruturas se rompem, deixando uma erosão no local, e posteriormente, são formadas crostas na área afetada. A completa resolução clínica da doença ocorre após cerca de duas semanas da infecção (Leme *et al*., 2015; Joshi *et al*., 2016a).

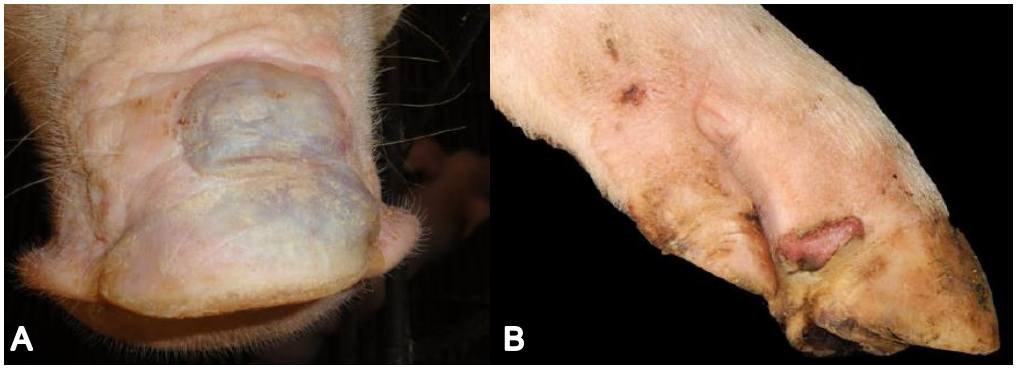

Figura 6 – Lesões causadas por infecção natural por SVA. A – Focinho, matriz. Grande vesícula típica de infecção por SVA presente na face dorsal do focinho. B – Casco, matriz. Ulceração da banda coronária. Fonte: Segalés *et al*., 2017.

Na histopatologia da pele de suínos que apresentavam lesões vesiculares nos cascos foi observada dermatite na banda coronária, caracterizada pela separação multifocal entre a derme e a epiderme, com formação de uma fenda subepidérmica preenchida de células inflamatórias. Nessas áreas foi visto edema com grande número de queratinócitos necróticos, hemorragia leve, fibrina e infiltrados inflamatórios constituídos de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos (Joshi *et al*., 2016a).

Durante a fase aguda da doença, foi avaliada a distribuição do SVA nos tecidos, e foram isoladas partículas virais viáveis entre o 3° e o 5° d.p.i. em amostras de pulmão, linfonodos mediastinais e mesentéricos, fígado, baço, intestino delgado, intestino grosso e tonsilas. No entanto, só foram observadas alterações histológicas nas tonsilas, no baço, nos linfonodos e nos pulmões, caracterizadas por uma leve a moderada hiperplasia linfoide (Figura 7A) (Joshi *et al*., 2016a). Além disso, neste estudo também foram observadas altas quantidades de RNA do SVA nas tonsilas na fase de convalescência (38° d.p.i.) da doença (Figura 7B).

A eliminação viral foi evidenciada em secreções orais e nasais, e nas fezes podendo ser detectada até 28 dias após a infecção, em suínos experimentalmente inoculados com o

SVA. Foram detectados valores de 10^3 a 10^4 cópias genômicas/mL nesses espécimes clínicos no 28°dia. Foram isoladas partículas virais viáveis nas excreções orais até 21 d.p.i. (Joshi *et al*., 2016a). Esses dados sugerem que secreções orais, nasais e fezes constituem importantes fontes de disseminação do SVA para animais susceptíveis, bem como as amostras de fluido vesicular que apresentam alta carga viral ($2{,}0x10^7$ até $1{,}2x10^{11}$ cópias genômicas/mL) (Leme *et al*., 2015).

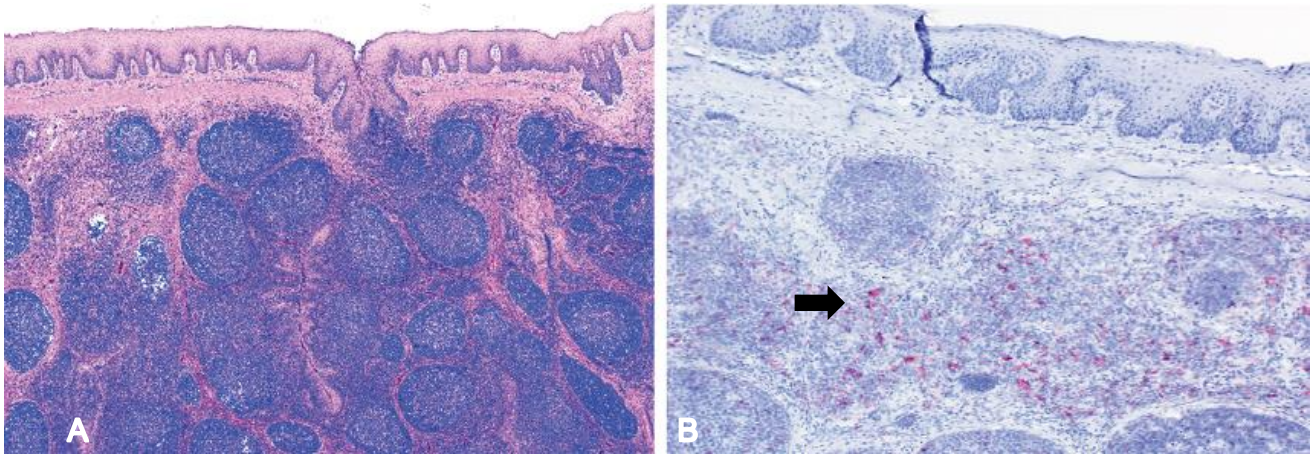

Figura 7 – Alterações histológicas observadas em animais inoculados com SVA. Corte histológico da tonsila de um animal infectado com SVA (4° d.p.i.). A – Alterações caracterizadas por hiperplasia linfoide. B – Hibridização *in situ* demonstrando a presença de ácido nucleico do SVA (coloração rósea - seta) nos folículos linfoides. Fonte: Joshi *et al*., 2016a.

Leitões com até cinco dias de vida naturalmente infectados pelo SVA demonstraram sinais clínicos como fraqueza muscular, letargia, salivação excessiva, hiperemia cutânea, manifestações neurológicas e diarreia, alguns animais apresentaram morte súbita. No entanto, nos leitões que permaneceram foi observada a resolução total da doença após cerca de 3 a 10 dias. (Leme *et al*., 2016). Estudos mostram que a taxa de mortalidade nesta categoria retorna à normalidade após 2 a 3 semanas do início dos surtos (Segalés *et al*., 2017). Foi também realizado um experimento com inoculação do SVA em leitões de 28 dias de vida, e nesses animais foi observado letargia, laminite, diarreia (Figura 8) e formação de pequenas vesículas na mucosa oral e nos cascos a partir do 2° dia de infecção (Liu *et al*., 2021).

As manifestações macroscópicas mais frequentemente observadas por Leme *et al*., (2016) nos leitões neonatos foram hemorragias petequiais nos rins, lesões ulcerativas na língua (Figura 9A), e nas bandas coronárias, edema pulmonar, leves impressões das costelas na superfície da pleura e congestão dos vasos da meninge (Figura 8B). Pneumonia intersticial foi a alteração histopatológica predominantemente relatada nessa categoria. Outras lesões comumente observadas na histologia foram: a miocardite linfocítica, a degeneração hidrópica (balonosa) do epitélio de transição da bexiga urinária e dos ureteres, a encefalite

linfoplasmocítica e a atrofia somada a fusão das vilosidades intestinais, associada à vacuolização das células epiteliais superficiais do intestino delgado (Leme *et al*., 2016).

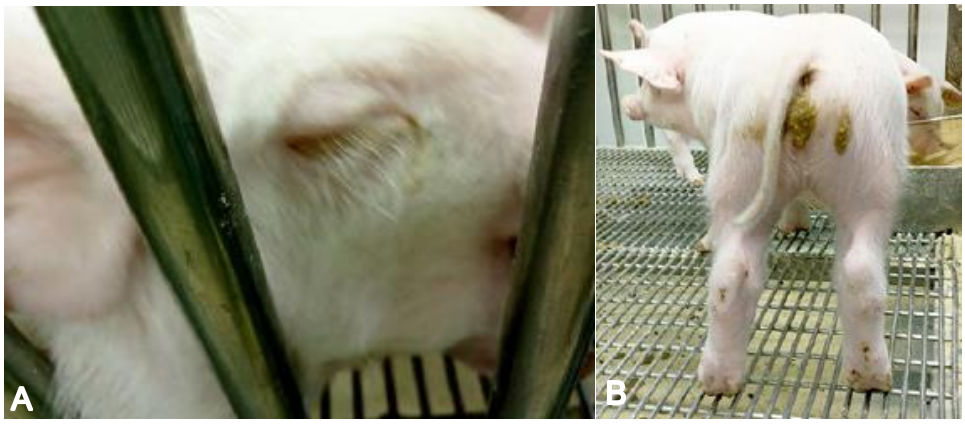

Figura 8 – Sinais clínicos observados em leitões de 28 dias inoculados com SVA. A – Letargia observada no 2° d.p.i. B – Diarreia causada pela infecção por SVA observada no 3°dpi. Fonte: Liu *et al*., 2021.

Animais de 28 dias de idade experimentalmente infectados com SVA demonstraram lesões histopatológicas, como hemorragia, edema e infiltrado de células inflamatórias, em órgãos como pulmão, fígado, coração, intestino delgado, rim e linfonodos (Liu *et al*., 2021). O RNA do *Senecavirus A* foi detectado na língua, gengiva, pulmão, fígado, rim, bexiga, cérebro e intestino delgado de leitões até cinco dias de idade (Leme *et al*., 2016). Entretanto, foi observada marcação específica na imunohistoquímica (IHC) apenas no epitélio de transição da pelve renal e da bexiga urinária, nas células epiteliais e ependimárias do plexo coroide e no endotélio vascular e nos enterócitos das vilosidades do intestino delgado (Leme *et al*., 2016). Nos leitões de 28 dias o RNA do vírus também foi detectado no fígado, baço, pulmão, rim e linfonodos, mostrando que o vírus se distribui para vários órgãos do hospedeiro (Liu *et al.,* 2021).

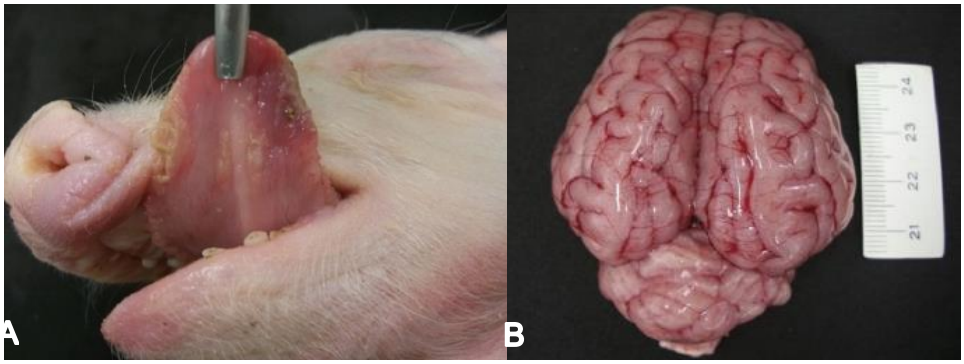

Figura.9 – Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia de leitões recém-nascidos naturalmente infectados por SVA. A – Glossite diftérica. B – Congestão dos vasos meníngeos do cérebro. Fonte: Leme *et al*., 2016.

Foram também testados outros agentes possivelmente relacionados aos sinais clínicos observados, como vírus da diarreia epidêmica dos suínos (PEDV), *Sapelovirus A*,

Teschovirus A, e Circovírus suíno tipo 2 (PCV2). No entanto, nenhum outro agente foi detectado nas amostras coletadas, sendo verificada apenas a presença do ácido nucleico do SVA nas lesões. Os resultados demonstram à suscetibilidade de leitões recém-nascidos a infecção por SVA, que além das lesões vesiculares apresentam outros sinais clínicos associados, resultando na síndrome neonatal multissistêmica (Leme *et al*., 2016).

3.6 Resposta Imune contra SVA

Estudos sugerem que a resposta imune produzida contra o SVA é caracterizada por um desenvolvimento rápido e robusto de anticorpos neutralizantes (NA). Esse padrão de resposta também é observado em outros membros da família *Picornaviridae*, com o aumento significativo de anticorpos logo no início da infecção fortemente correlacionada a redução da carga viral na corrente sanguínea, nos tecidos e nas secreções dos animais infectados (Dotzauer & Kraemer, 2012; Joshi *et al*.,2016a).

Dessa forma, foi avaliada a resposta imune adaptativa frente à infecção pelo SVA em suínos de terminação inoculados com o agente. Neste estudo foram detectados anticorpos neutralizantes logo no 5° d.p.i., atingindo concentrações máximas entre os dias 7 e 14 pós-infecção (Figura 10). E como observado em outros picornavírus, este rápido aumento dos níveis anticorpos neutralizantes apresentava alta correlação negativa com o número de cópias genômicas do SVA no soro desses animais, demonstrando o papel importante que os NA têm na eliminação do vírus durante a fase aguda da doença (Maggioli *et al*., 2018).

Segundo Maggioli e colaboradores (2018), foram identificados a partir do 5° e 7° d.p.i., respectivamente, tanto o isotipo IgM quanto o IgG (Figura 10) por meio do teste de imunofluorescência indireta (IFI), sendo que os anticorpos da classe IgM foram altamente correlacionados aos elevados níveis de NA presentes no soro. Posteriormente, para verificação de qual proteína estrutural viral estava especificamente associada à resposta humoral, foi realizado o imunoensaio de microesferas fluorescentes (FMIA), demonstrando que apesar de haver produção de anticorpos contra as três proteínas externas do capsídeo, as mais imunogênicas eram VP2 e VP3 (Yang *et al.,* 2012; Maggioli *et al*., 2018).

Após a fase clínica da doença, foi notada uma queda das imunoglobulinas do tipo IgM não sendo mais detectada a partir do 21° d.p.i., bem como IgG anti-VP1 e anti-VP3. No entanto, anticorpos IgG contra a proteína VP2 foram mantidos até 35 dias p.i. (Figura 10), corroborando com estudos anteriores nos quais a classe IgG contra SVA foi detectada até 38 a 60 dias pós-infecção (Yang *et al*., 2012; Joshi *et al*., 2016a). Este resultado, sugere que o IgG anti-VP2 seja responsável pela neutralização viral durante a fase crônica da doença (Maggioli *et al.,* 2018). No entanto, Gimenez-Lirola e colaboradores (2016) detectaram anticorpos IgG anti-VP1 até seis semanas após o surto de SVA, tanto em animais que apresentaram sinais clínicos quanto em suínos que não tiveram lesões, sugerindo que possa

haver também a participação dessa imunoglobulina na neutralização viral durante a fase crônica da infecção.

Além da resposta humoral, o contato com antígenos do *Senecavirus* estimula uma forte imunidade celular logo nas primeiras semanas da infecção. A partir do 7° d.p.i. pode ser observado um aumento significativo de células T αβ, correlacionado a elevados níveis de células T $CD4^+$ expressando interferon-gama (IFN-γ). Também foi relatada uma elevação na frequência de células T CD8+ e $CD4+CD8^+$ duplamente positivas, no 10° d.p.i., com produção de IFN-γ (Figura 10) em resposta ao estímulo promovido pelo SVA (Maggioli *et al*., 2018). O interferon-gama possui ações importantes na imunidade contra micro-organismos intracelulares, pois atua na ativação de macrófagos bem como na diferenciação de células T $CD4^+$ no subgrupo Th1 (Abbas, 2015).

No intuito de avaliar a resposta imune celular no período crônico da doença, foram coletadas células mononucleares do sangue periférico de animais no 35° dia pós-infecção para ensaios de liberação de IFN-γ. Neste teste foi possível observar o mesmo padrão de resposta de células T detectado durante a fase aguda, com aumento na produção de IFN-Y pelos linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD4^+CD8^+$. Esse resultado também sugere que a infecção por SVA consegue induzir células T de memória, visto que houve uma resposta específica rápida contra o antígeno no teste de reestimulação *in vitro* (Maggioli *et al*., 2018). Além disso, foi observado que assim como na indução da imunidade humoral as três proteínas externas do capsídeo viral apresentam epítopos com capacidade de se ligar e estimular os linfócitos T. Esses resultados sugerem que a integração entre as respostas humoral e celular é importante para o controle da infecção causada pelo *Senecavirus A* (Maggioli *et al.,* 2018).

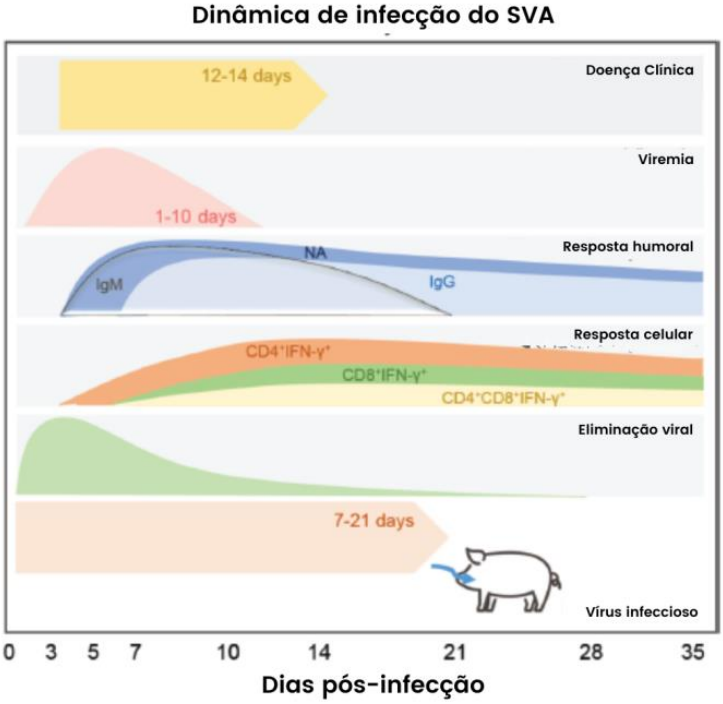

Figura 10 – Dinâmica de infecção do SVA. Primeiramente, é observado um curto período de incubação (3-5 dias), com duração dos sinais clínicos até 14 dias após a infecção. Pode ser notado uma curta viremia (1-10) fortemente, correlacionada ao rápido aumento de anticorpos neutralizantes detectados a partir do 5° d.p.i. No 7°d.p.i. é visto o aumento das células T principalmente T $CD4^+$, que também está associada à eliminação da infecção viral. O RNA viral pode ser detectado nas fezes e secreções oral e nasal até 28 dias pós-infecção, sendo que partículas virais viáveis são isoladas da secreção oral até 21 d.p.i. Fonte: Adaptado de Maggioli *et al.*, 2018.

Em leitões de 28 dias experimentalmente infectados com SVA também foi observada uma forte resposta imune humoral detectada logo nos primeiros dias de infecção. Esses animais apresentaram soroconversão no 5° d.p.i., com detecção contínua de anticorpos até o 14° dia. No entanto, NA foram observados apenas a partir do 7° d.p.i. (Liu *et al*., 2021). Outro aspecto importante a ser abordado na imunidade contra o SVA em leitões é a capacidade de transferência de passiva de anticorpos observada em porcas soropositivas independentemente do estado clínico dessas matrizes. Estudos detectaram altos níveis de IgG em leitões com sete dias de vida. Esses níveis de anticorpos foram reduzindo até desaparecerem com seis semanas após o nascimento. Esse resultado sugere que o fornecimento de colostro possa ser uma ação de proteção neonatal contra a infecção por SVA (Gimenez-Lirola *et al.,* 2016).

Estudos de mecanismos de evasão do SVA ao sistema imune do hospedeiro ainda são insipientes. Entretanto, Liu *et al.* (2019) observou que proteínas não estruturais 2C e $3C^{pro}$ virais eram responsáveis pela supressão da imunidade inata do organismo causando apoptose celular por meio da ativação de caspases, proteases envolvidas a iniciação e execução da morte celular programada, e dessa forma favorecendo a replicação viral. Adicionalmente, estudos recentes realizados por Oliveira e colaboradores (2021) sugerem que a infecção causada pelo SVA também é capaz de provocar depleção linfoide em leitões lactentes devido a apoptose de linfócitos B, evidenciada pela redução da expressão do marcador Ki-67, substância liberada durante a divisão celular.

3.7 Diagnóstico do *Senecavirus A*

Diante da incapacidade de distinção entre a doença vesicular causada pelo *Senecavirus A* de lesões associadas à Febre Aftosa ou a Estomatite Vesicular, que são doenças de notificação obrigatória. É necessário que seja feito um diagnóstico rápido e confiável para realização da diferenciação entre as enfermidades. O diagnóstico do SVA pode ser feito por meio de métodos diretos com a detecção do vírus, de antígenos virais ou do RNA viral, e também por testes indiretos que detectam a resposta imune do hospedeiro contra o agente (Zhang *et al*., 2018; Houston *et al*., 2020).

Dentre as técnicas de detecção do agente viral temos o isolamento que é baseado na observação do efeito citopático característico do SVA, que consiste em arredondamento e lise celular. Para realização desta técnica já foram utilizadas várias linhagens de células diferentes, como NCI-H1299 – células de carcinoma pulmonar humano; IBRS-2 e PK-15 –

células de rim de suíno; ST-6 – células de testículo de suínos; e BHK-21 – células de rim de hamster neonato (Yang *et al*., 2012; Zhu *et al*., 2017; Leme *et al*., 2015; Qian *et al*., 2016).

Pinheiro de Oliveira (2019) fez tentativas de isolamento do SVA em cinco tipos de células diferentes, e o arredondamento e a lise celular foram observados apenas na linhagem NCI-H1299. Estudos de comparação da cinética do SVA em três linhagens celulares demonstraram que a NCI-H1299 era a mais susceptível ao vírus, produzindo altos títulos virais (10^9 UFP/mL) após 24 horas da inoculação (Yang *et al.*, 2012).

No entanto, o uso do isolamento em cultura de células na rotina de diagnóstico do SVA e de outros agentes virais pode apresentar alguns desafios, como a necessidade de pessoal treinado para execução da técnica, o alto custo associado à compra e manutenção de insumos para as diferentes linhagens celulares, a possibilidade de contaminação bacteriana, e o longo tempo de espera para incubação dependendo do patógeno, como por exemplo, o vírus da dengue que deve permanecer cerca de cinco dias na estufa para ser isolado (Medina *et al*., 2012; Hermatian *et al*., 2016).

Existem diversas técnicas de RT-PCR disponíveis para detecção do ácido nucleico do SVA. Alguns exemplos, podem ser citados como Dall Agnol *et al*. (2017) que desenvolveram um RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando sonda fluorescente (Taq-man®) para amplificação de uma região conservada da proteína estrutural VP1. Neste estudo, o teste foi capaz de quantificar o RNA do SVA em amostras de tecido de leitões de 15 semanas de idade, apresentando um limite de detecção de 13 cópias genômicas/µL. O ensaio de nested RT-PCR com alvo na proteína VP1 (316 pb) foi descrito por Feronato *et al*. (2017), e demonstrou maior sensibilidade que o RT-PCR convencional sem perda da especificidade. Pinheiro de Oliveira et al. (2019) relataram desenvolvimento da técnica de RT-PCR digital em gotas (ddRT-PCR). Além disso, o sequenciamento de nova geração (NGS) também já foi utilizado em estudos de identificação e epidemiologia molecular do SVA (Vanucci *et al*., 2015).

Apesar da rapidez, da alta sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares na detecção do SVA e de outros patógenos virais, esses testes apresentam desvantagem associada à identificação inconstante dos agentes devido à progressão da infecção. Visto que são relatadas variações na excreção e na carga viral em diferentes amostras biológicas. Por isso, é recomendada a coleta de vários tipos de amostras incluindo soro, tonsilas, fezes e fluidos orais e vesiculares, para diagnóstico do SVA por meio de técnicas moleculares (Gimenez-Lirola *et al.,* 2016).

São relatados também outros métodos diretos, como a hibridização *in situ* (ISH) e a imunohistoquímica (IHC), que são ferramentas importantes no estudo da patogenia da infecção pelo SVA (Leme *et al*., 2016; Resende *et al*., 2017). Esses testes permitem identificar a presença do patógeno associado com alterações morfológicas nos tecidos (Maes *et al*., 2014).

A detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A* além de possibilitar o processamento de um grande número de amostras, permite avaliar a situação epidemiológica do rebanho, indicando se houve exposição prévia ou se o agente está presente na granja (Goolia *et al*., 2017). Os testes de soroneutralização, ensaio de absorção imunoenzimático competitivo (cELISA) e imunofluorescência (IFI) estão disponíveis para o diagnóstico indireto do SVA. O trabalho de desenvolvimento e validação desses ensaios foi realizado por Goolia e colaboradores (2017), e demonstrou alta concordância entre os três ensaios, indicando que são adequados para a detecção de anticorpos contra o SVA.

Foi também desenvolvido um ELISA indireto com base na proteína VP2 do capsídeo viral que apresentou sensibilidade de 94,2% e especificidade de 89,2%. No entanto, neste mesmo estudo foi demonstrada uma variação na concordância entre este método e a técnica de IFA de acordo com a fase da doença, com base nos resultados o teste ELISA se mostrou mais sensível no início da infecção (Dvorak *et al*., 2017). Bai *et al.,* (2021) desenvolveram um teste cELISA baseado em partículas pseudovirais (VPLs) e os resultados mostraram especificidade e sensibilidade de 100% e 94%, respectivamente. Além de apresentar taxa de concordância de 90% com o cELISA comercial – *AsurDx™ Senecavirus A Antibody Test Kit (Biostone™)* – e de 94,2% com o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI).

Embora ainda não esteja disponível para o diagnóstico do SVA, o teste de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) é comumente utilizado para detecção de patógenos importantes para a criação de suínos, por exemplo, o vírus da Peste Suína Africana (PSAV), o Circovirus Suíno (PCV), o Vírus da Síndrome Reprodutiva Respiratória em Suínos (PRRSV). De acordo com a OIE, o IPMC deve ser utilizado como teste confirmatório para diagnóstico sorológico em áreas livres e endêmicas de PSA (Gerber *et al*., 2011; OIE, 2021). Gallardo e colaboradores (2015) observaram maior sensibilidade do método de IPMC em relação aos testes ELISA comerciais para detecção de anticorpos contra PSA em amostras de animais experimentalmente infectados e em espécimes de campo, uma vez que o IPMC foi capaz de detectar anticorpos em um ponto mais precoce da resposta sorológica.

A dificuldade de distinção dos sinais clínicos da infecção do SVA de outras doenças vesiculares clássicas, somada a inconstância dos resultados do PCR entre as espécimes coletadas, demonstram a necessidade de associação entre histórico clínico e epidemiológico, métodos moleculares e sorológicos para garantir um diagnóstico definitivo de SVA (Houston *et al*., 2020).

3.8 Prevenção e Controle

Ainda não há tratamento específico e nem vacina comercial contra o *Senecavirus A* no mundo. No entanto, já existem trabalhos mostrando possíveis candidatas para vacinação em suínos (Liu *et al*., 2020). O grupo de Sharma *et al*., (2019) desenvolveu uma vacina viva

atenuada baseada na utilização de vírus recombinante produzido por genética reversa, e observou que uma única dose dessa formulação vacinal foi capaz de proteger os animais contra o desafio realizado com isolado de SVA diferente do vacinal, pois foi demonstrada a ausência de sinais clínicos da doença e redução da viremia, da eliminação do agente e da carga viral nos tecidos analisados. Foi relatada recentemente, a tentativa de produção de uma vacina contendo pseudovírus composto pelas proteínas do capsídeo viral, VP0, VP1 e VP3. Neste estudo, apesar de a vacina inativada ter apresentado maiores níveis de resposta imune humoral e celular, a vacinação utilizando partículas semelhantes a vírus (VLPs) também promoveu proteção contra a doença, pois não foram notados sinais clínicos e RNAnemia nos suínos vacinados (Mu *et al*., 2020).

Yang e colaboradores (2018) mostraram que uma única dose (2µg) da vacina inativada contra SVA foi capaz de proteger todos os leitões na fase de terminação após a realização dos ensaios de proteção. Pois nenhum dos animais apresentou febre ou qualquer outro sinal clínico da doença. Além disso, esse grupo de pesquisadores observou que porcas vacinadas no 38° e no 78° dias de gestação com vacina inativada contra SVA foram capazes de transferir anticorpos maternos contra o agente para os leitões por meio do colostro. As imunoglobulinas maternas foram mantidas até aproximadamente 98 dias após nascimento em leitões cujas mães receberam a vacina contendo a maior concentração de antígeno (4 µg). Esse resultado sugere que a vacinação poderá se tornar uma importante medida de prevenção da mortalidade de neonatos durante surtos de *Senecavirus A* (Yang *et al*., 2021).

Por ser um vírus não envelopado e a transmissão ocorrer por contato direto e indireto, as medidas sanitárias adotadas para prevenção e controle do SVA devem incluir tanto os animais quanto o ambiente. Em vista disso, a introdução do *Senecavirus* no rebanho bem como a de outros patógenos pode ser evitada por meio da adoção de rígidas ações de biossegurança (Leme *et al*., 2017). Os veículos de transporte, os equipamentos de remoção de carcaças e o acesso de funcionários de forma descontrolada foram citados como as principais fontes de introdução do agente na granja (Baker *et al*., 2016).

Dessa forma, a entrada de veículos, equipamentos, pessoas, animais e alimentos devem ser rigorosamente controlados na unidade de produção de suínos. Por isso, é recomendado que a área de circulação de veículos ao redor da granja seja distante das instalações onde os animais estão alojados. Além disso, o transporte dos suínos deve ser realizado por veículo limpo e que não tenha tido contato com pessoas ou animais de rebanhos positivos para *Senecavirus* (Reis, 2014; Baker *et al.,* 2016).

Medidas de biossegurança para acesso e movimentação de pessoas também devem ser empregadas, como por exemplo, os funcionários devem tomar banho ao entrar e ao sair das instalações bem como trocar as roupas e as botas, e também não devem ter tido contato com outros suínos por um período mínimo de 48 a 72 horas (Reis, 2014; Baker *et al.*, 2016).

No caso de animais reposição, esses devem ser preferencialmente adquiridos de granjas livres de agentes infecciosos importantes, testados e mantidos em quarentena antes de serem introduzidos ao rebanho. Além disso, por ter sido detectado RNA do SVA em fezes de ratos e em moscas domésticas, o controle de pragas se torna uma medida preventiva relevante, como também a restrição do acesso de outros animais domésticos às instalações (Reis, 2014; Baker *et al.*, 2016).

Em granjas onde o SVA já é um problema, é indicado que sejam seguidos rígidos protocolos de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, com a utilização dos desinfetantes apropriados na diluição e tempo adequados, além da adoção do sistema *all in/all out,* respeitando o tempo estimado de vazio sanitário (Baker *et al.,* 2016). Um estudo mostrou que a utilização de desinfetantes comerciais à base de peróxido de hidrogênio acelerado (AHP) foi eficaz contra o vírus da febre aftosa, vírus da doença vesicular de suínos e o *Senecavirus A*, quando aplicados na diluição de 1:20 durante 10 minutos, que são valores acima da recomendação do fabricante (Hole *et al*., 2017).

Além das medidas mencionadas é recomendada a realização do monitoramento soroepidemiológico do rebanho, para avaliação dos níveis de anticorpos nos rebanhos. Sendo importante ressaltar que conforme o Ofício Circular Conjunto n°1/2019/DIPOA/DSA/SDA de 28 de fevereiro de 2019 a suspeita de qualquer doença vesicular em sistemas de criação ou em abatedouros de suínos deve ser imediatamente notificada ao Serviço Veterinário Oficial (SVO), que fará a investigação e o diagnóstico diferencial da infecção por SVA de outras doenças vesiculares clássicas, bem como a interdição imediata do estabelecimento e de seus produtos (Brasil, 2020).

3.9 Análise Estatística

O índice kappa é uma ferramenta padrão para a análise de concordância entre duas variáveis nominais dicotômicas, como por exemplo, a comparação dos resultados (positivo e negativo) entre dois métodos de diagnóstico. Para realização do cálculo de κ, deve ser considerada a acurácia encontrada em comparação com a acurácia esperada, levando em conta que o teste de referência e a nova técnica foram realizados de forma independente (Daly and Bourke, 2000). Para a interpretação do índice Kappa, *Landis and Koch* (1977) propuseram os padrões descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Interpretação do índice Kappa

Valor de κ	Nível de Concordância
<0.00	Pobre
0.01-0.20	Fraca

0.21-0.40	Razoável
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Forte
0.81-1.00	Quase perfeita

Fonte: Adaptado de Landis and Koch (1977).

A acurácia de um teste de diagnóstico corresponde à capacidade desse método em classificar corretamente duas condições, por exemplo, doente (positivo) e saudável (negativo). Dessa forma, para determinação da eficácia do teste de IPMC, foi utilizada a análise da curva de ROC (Intervalo de Confiança de 95%) que consiste em uma ferramenta de representação gráfica que avalia o efeito de diferentes que pontos de corte têm sobre os valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) de um teste (Metz, 1978; Castanho *et al*., 2004). Essa análise, geralmente é realizada em conjunto com a avaliação da área sobre a curva (AUC) que corresponde à medida global da acurácia do teste. A interpretação da AUC é feita por meio da observação da proximidade da curva ao canto superior esquerdo do gráfico, quanto mais essa se aproxima, maior é a capacidade do teste em discriminar os resultados positivos e negativos. Dessa forma, esses parâmetros permitem obter o ponto de corte mais apropriado, que apresenta os melhores valores de Se e Sp do novo teste em relação ao método de referência (Lopes *et al.,* 2014).

O índice de Youden (J) também pode ser utilizado para avaliar a desempenho global do teste, pois fornece critérios para escolha do valor de corte “ideal”, para o qual os valores de Se e Sp máximos podem ser obtidos. O cálculo do J é feito com base no Valor Esperado (VE) de cada ponto de corte avaliado. Os VEs podem ser obtidos diretamente multiplicando os custos de decisões erradas e os benefícios de escolhas corretas por suas proporções correspondentes, somado aos parâmetros de falso-positivo falso-negativo, e verdadeiro-positivo e verdadeiro-negativo. O ponto de corte que apresentar menor valor é o mais apropriado para o novo teste (Smits, 2010). Além disso, o J tem como vantagem, em relação a outros testes, a característica de não ser afetado pela prevalência da doença (Greiner *et al*., 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG (LPVA-UFMG).

4.2 Cultivo celular

As células de linhagem epitelial de carcinoma pulmonar humano provenientes do subcultivo da amostra NCI-H1299, ATCC® CRL-5803™, gentilmente cedidas pelo LFDA-MG,

foram cultivadas em garrafas planas com 25 cm² de área para cultivo celular (A25), em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO™), suplementado com 1,5% de caldo triptose fosfato (TPB) (BD Difco™), 5% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO™), 1% de solução de penicilina G sódica (10MU) (Sigma-Aldrich) e sulfato de estreptomicina (720 I.U/mg) (P/S) (Sigma- Aldrich) e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2.

4.3 Amostra viral

Para o desenvolvimento das técnicas de soroneutralização e IPMC foram inicialmente, avaliadas duas amostras de isolados de *Senecavirus A*. A primeira CR006/19 gentilmente cedida pelo LFDA-MG, e a segunda SVA LPVA4 isolada no surto de *Senecavirus* no Brasil em 2015, atenciosamente cedida pelo Professor Dr. Roberto Guedes do Laboratório de Patologia Molecular da EV-UFMG. Foram realizadas inoculações dos isolados de SVA em quatro passagens consecutivas em monocamada de células da linhagem NCI-H1299 (ATCC® CRL-5803™) com 80-90% de confluência. As garrafas eram incubadas por cerca de 48-72 horas na estufa a 37°C com 5% de CO_2, e ao ser observado 90% de efeito citopático (ECP) ou quando atingia o tempo de incubação de 96 horas, os inóculos eram congeladas a -80°C, para que toda a monocamada fosse desprendida. Após multiplicação das amostras, foi feita a titulação viral pelo método de *Reed and Muench* (1983) conforme descrito por Saporoti *et al*. (2017). A amostra viral foi escolhida com base na intensidade e no tempo de incubação necessário para observação do efeito citopático, ou seja, proporção de arredondamento e lise celular pelo período de incubação, além do título viral final obtido após esse processo.

4.4 Multiplicação da amostra viral SVA LPVA4

Os estoques virais foram obtidos a partir do cultivo de células NCI-H1299 infectadas com o SVA LPVA4. Uma garrafa A175 (175cm^2) com monocamada com 80% de confluência, após a lavagem por duas vezes com solução tampão fosfato salina (PBS1X) (NaCl 137mM; KCl 7mM; Na2HPO4 1,4mM, pH 7,2) foi infectada com 2mL de vírus (1x10^{7,7}TCID50/mL) diluído 1:10 em MEM adicionado de 1% P/S. A garrafa foi incubada por uma hora em atmosfera de 5% de CO_2, para adsorção viral. Posteriormente, foram acrescentados 33 mL de MEM com 2,5% de SFB e a garrafa mantida na estufa a 37ºC. Foram feitas observações diárias em microscópio óptico de luz invertida, até a detecção de 90% de ECP, que ocorreu aproximadamente, 48 horas após a incubação. Em seguida, o inóculo foi aliquotado e armazenado a -80°C. Como controle negativo, foi utilizada uma garrafa A25 com monocamada com 70% de confluência, incubada com 500 µL de MEM puro por uma hora, posteriormente, foi acrescido de 4,5 mL de MEM com 2,5% de SFB, e mantida na estufa a 37°C durante as 48 horas.

4.5 Titulação viral SVA LPVA4

O título dos estoques virais foi determinado por ensaio em placa de 96 poços, de acordo com método de *Reed and Muench* (1983). Após o descongelamento, uma alíquota do vírus foi submetida a uma série de dez diluições seriadas na base 10, em MEM com 1% de P/S. Em seguida, 50µL de cada diluição foram distribuídas nas respectivas colunas (em octuplicata) na placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 100µL de suspensão de células NCI-H1299 considerando 50.000 cél./cm^2/poço em MEM acrescido de 2,5% de SFB. A placa foi incubada a 37ºC em estufa de CO_2 por 48-72 horas. Foi incluído controle de células na última coluna da placa. Após esse período, foi realizada a leitura em microscópio óptico invertido, para verificação do efeito citopático nas células. O cálculo do título viral foi feito pela dose infectante para 50% dos cultivos celulares ($TCID_{50}$/mL) utilizando a fórmula:

$$K = \frac{(\%\ \text{positivo acima de } 50\%) - 50}{(\%\ \text{positivo acima de } 50\%) - (\%\ \text{positivo abaixo de } 50\%)}$$

4.6 Avaliação da cinética viral isolado SVA LPVA4

A cinética de replicação do isolado SVA LPVA 4 foi avaliada por teste realizado em placa de 24 poços em cultura de células NCI-H1299, infectadas com concentrações de multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1,1 e 10. Primeiramente, foram adicionados 950µL de suspensão de células considerando 43.000 cél/cm^2/poço em MEM com 2,5% de SFB. Em seguida foi feita a adição das diluições do vírus nos respectivos poços. A placa foi incubada a 37°C em estufa de CO_2, e a coleta das concentrações foi feita por meio da raspagem da monocamada junto ao do sobrenadante em cada poço após 24, 48 e 72 horas de incubação. Foi incluso o controle de células na placa. A determinação do título viral foi feita pelo método de *Reed & Muench*, expresso em $TCID_{50}$ e com leitura após 48-72horas (Saporoti *et al.,* 2017; Sharma *et al*., 2019; Mu *et al*., 2020).

4.7 Amostras de soro de suíno

Para o desenvolvimento das técnicas de SN e IPMC foram utilizadas oito amostras padrão de soro suíno, sendo quatro amostras positivas, gentilmente cedidas pelo LFDA-MG, e previamente testadas no ensaio de vírus neutralização do LFDA-MG. E quatro amostras negativas provenientes do banco de soro de 2009 do LPVA-UFMG coletadas em granjas de Minas Gerais durante a realização de um trabalho de doutorado. Essas amostras foram escolhidas como controle padrão negativo em acordo com os resultados obtidos em estudos sorológicos retrospectivos de Saporoti *et al*., 2017 cujas evidências demonstraram que o SVA ainda não circulava nas principais regiões produtoras de suínos brasileiras antes de 2014. A quantidade mínima de amostras de referência utilizadas para o desenvolvimento dos testes

foi definida de acordo com capítulo *Principles and Methods of Validation of Diagnostic assays for infectious diseases* (OIE, 2019).

Em seguida, para a avaliação do desempenho e comparação entre os testes de IPMC e SN foram escolhidas aleatoriamente 50 amostras de soro de suíno provenientes do banco de soros formado a partir de amostras enviadas ao LFDA-MG, durante casos de suspeita de doença vesicular em granjas brasileiras, em 2021. Esses soros eram encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA-UFMG) somente após a confirmação do diagnóstico negativo para Febre Aftosa e Estomatite Vesicular realizado pelo LFDA-MG. O cálculo do número de amostras foi estimado com base no valor de observações estabelecido por Donner & Eliasziw (1992) para avaliação do Coeficiente Kappa com intervalo de confiança mínimo de 95%.

4.8 Teste Soroneutralização (SN) para SVA

Os ensaios de neutralização viral foram realizados conforme o protocolo MET/LDDV/PL/063 –V.3 (LFDA, 2019) com modificações. Para realização do método foram utilizadas células da linhagem NCI-H1299 (ATCC® CRL-5803™), em placas de fundo chato com 96 poços para cultivo celular. Primeiramente, os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos. Em seguida, foi feita a distribuição do MEM sem soro fetal bovino na placa. Dessa forma, foram adicionados 93,75µL na linha A dos soros teste, 87,5µL na linha B e 50µL nos poços C até H. Na primeira placa foram incluídos a retrotitulação, os controles de soro padrão positivo e negativo, o controle de células e o controle de vírus. Nos poços da retrotitulação foram colocados 50µL de MEM, nos controles na linha A 87,5µL e no restante da coluna 50µL, no controle de células 100µL e no de vírus 50µL.

Posteriormente, foram adicionados 6,25µL dos soros teste na linha A em duplicata, para avaliação da toxicidade das amostras de soro na monocamada. Na linha B foram colocados 12,5µL das mesmas amostras em duplicata, resultando na diluição 1:16. Em seguida, foi feita a diluição seriada na base dois, com auxílio da micropipeta multicanal, passando 50µL da linha superior para a inferior, e assim sucessivamente até o final da placa. Depois, foram adicionados 50µL da diluição de trabalho do vírus, contendo 100$TCID_{50}$/poço, exceto nas colunas referentes à retrotitulação e ao controle de células. Como controle padrão positivo foi utilizado soro suíno previamente testado pelo LFDA-MG, e negativo proveniente do banco de soros do LPVA-UFMG de 2009, testados anteriormente seguindo este mesmo protocolo. Após a adição do vírus, as placas foram incubadas por uma hora a 37°C em estufa de CO_2, e dessa forma, permitir a interação anticorpo com o antígeno. Ao final, foi feita a adição de 50µL da suspensão de células por poço, considerando 36.500 cél/cm^2/poço, com micropipeta multicanal, e então, encubadas a 37°C por 48 horas (Figura 11).

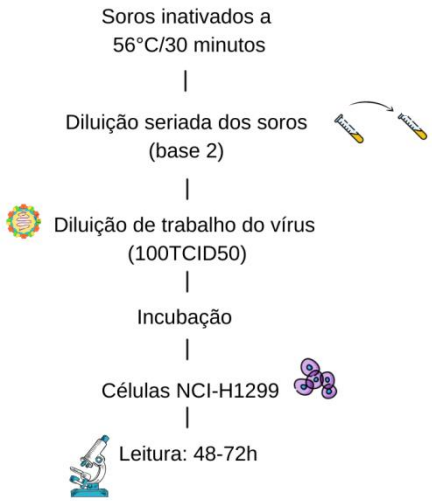

Figura 11 – Fluxograma de execução do teste de Soroneutralização do SVA. Fonte: Adaptado de LFDA/2019.

A interpretação dos ensaios de neutralização viral foi realizada com base em Mu *et al*. (2020), no qual o resultado do título de anticorpos neutralizantes do soro é expresso pela maior diluição em que não foi observado mais de 50% de ECP na monocamada. Os níveis de anticorpos protetores são definidos com base na capacidade dessas estruturas de neutralizar o vírus, impedindo a destruição das células. Neste teste, amostras com título igual ou acima de 1:64 eram consideradas positivas (Goolia *et al*., 2017; Saporoti *et al*., 2017).

4.9 Desenvolvimento da técnica de IPMC para SVA

Os parâmetros de execução da técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) para SVA foram desenvolvidos com base em Gerber *et al*. (2011). Para realização do teste utilizadas células da linhagem NCI-H1299, em placas 96 poços para cultivo de celular. Inicialmente, foram analisadas duas concentrações celulares: $5x10^4$ e $3,65x10^4$ células por cm^2, infectadas com duas concentrações de vírus: 0,1 e 1 MOI, observadas em dois tempos de incubação 64 e 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO_2. Após a incubação as placas foram fixadas em solução de metanol e acetona (1:1) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram mantidas sem tampa até a secagem completa dos poços e posteriormente, foram congeladas a -20°C.

Para o desenvolvimento da técnica foram realizadas diluições seriadas dos soros padrão na base 4 (1:20 a 1:1280), em solução de albumina bovina (1.5%, 2.5%, 3.5%), em solução de PBS-Tween 20 0,05% com (1.5%; 2%, 3%, 5%) de leite em pó. Além disso, também foi avaliada a diluição do anticorpo secundário na solução tampão (SFB 2.5%; Soro de coelho 1.0%; Tween 80 0,08% e PBS1X 96,42%). Posteriormente, 50µL de cada poço foram distribuídos com auxílio da micropipeta multicanal, nas placas infectadas previamente descongeladas.

As placas foram incubadas a 37°C durante uma hora e depois lavadas com solução de lavagem (Salina 0.85%; Tween 20 0,05%). Em seguida, proteína G conjugada com peroxidase (Invitrogen®) nas diluições 1:100, 1:200 e 1:250, e anti-IgG suíno conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:100 em PBS 1X foram adicionadas e as placas foram incubadas por uma hora e duas horas a 37°C. Ao final as placas foram novamente lavadas, e foi colocado 60µL da solução de reveladora (3-amino-9-diethyl-carbazole (AEC) em solução tampão acetato 50mM pH 5,0 com peróxido de hidrogênio 35%) incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em cada placa os soros controle negativo e positivo foram testados na monocamada infectada e no controle de células para verificação de reações inespecíficas. A leitura das placas foi realizada em microscópio de luz invertida, sendo observada a marcação rosada específica no citoplasma das células nas amostras de soro positivas. A leitura foi realizada por dois observadores diferentes.

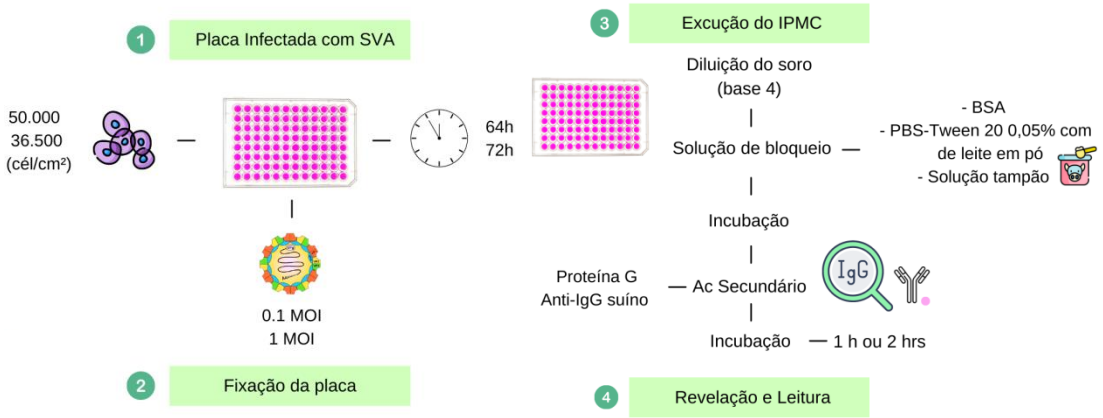

Figura 12 – Fluxograma de execução do teste de IPMC do SVA. Fonte: Adaptado de Gerber *et al*., 2011.

4.10 Avaliação do desempenho do IPMC para SVA

Para determinar o desempenho do teste de IPMC foram utilizadas 50 amostras de soro de suíno em duplicata proveniente de granjas brasileiras com suspeita de doença vesicular coletadas pelo LFDA-MG. Foram utilizadas placas de 96 poços contendo 36.500 células/cm^2 da linhagem NCI-H1299, infectadas com a concentração de 0,1 MOI do isolado SVA LPVA4, em MEM suplementado com 5% SFB. As placas foram incubadas durante 64 horas em estufa de CO_2. Como controle de células, na última coluna de cada placa foram acrescentados 100µL de suspensão celular sem adição viral.

Posteriormente, os poços foram fixados com solução de acetona:metanol (1:1) por 15 minutos em temperatura ambiente, e após a secagem as placas foram armazenadas a -20°C. Diluições seriadas dos soros padrão na base 4 (1:20 a 1:1280) foram realizadas em PBS-Tween 20 0,05% com 1,5% de leite em pó e 50µL de cada diluição, foram dispensados nas placas infectadas com SVA. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora a 37ºC e

posteriormente, lavadas com solução de lavagem. Foram adicionados 50µL do anti-IgG suíno conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich SAB 3700427-2), diluído em 1:100 em PBS 1X e novamente, incubados durante uma hora na estufa a 37°C. Ao final as placas foram novamente lavadas, e foi colocado 60µL da solução de reveladora (3-amino-9-diethyl-carbazole (AEC) em solução tampão acetato 50mM pH 5,0 com peróxido de hidrogênio 35%) incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em uma placa os soros controle negativo e positivo foram testados no controle de células para verificação de reações inespecíficas.

A leitura das placas foi realizada em microscópio de luz invertida, sendo considerada como positiva as amostras de soro nas quais foram observadas a coloração rosada específica no citoplasma das células. A leitura foi realizada por dois observadores diferentes.

4.11 Análise Estatística

Para avaliação da concordância entre o teste de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) e a soroneutralização, utilizado como teste de referência, foi aplicado o coeficiente de kappa (κ), e o ponto de corte e a acurácia foram determinadas com base no índice de Youden (J) associado aos parâmetros da área sobre a curva (AUC) e a curva de ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (Cohen, 1960; Youden, 1950).

Para realização do cálculo de κ, deve ser considerada a acurácia encontrada em comparação com a acurácia esperada, levando em conta que o teste de referência e a nova técnica foram realizados de forma independente (Daly and Bourke, 2000). Para a interpretação do índice Kappa, *Landis and Koch* (1977) propuseram os padrões descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Interpretação do índice Kappa

Valor de κ	Nível de Concordância
<0.00	Pobre
0.01-0.20	Fraca
0.21-0.40	Razoável
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Forte
0.81-1.00	Quase perfeita

Fonte: Adaptado de Landis and Koch (1977).

As análises foram feitas pelo software Epitools – Epidemiological Calculators (Sergeant, ESG, 2018. Ausvet. Disponível em: http://epitools.ausvet.com.au.) e pelo Stata® Statitics Data Analasys (Version 16.0) software (StataCorp. 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Amostra Viral

O isolado SVA LPVA4, coletado durante os surtos de *Senecavirus A* em 2015, foi escolhido como amostra viral para o desenvolvimento dos testes de soroneutralização e IPMC. O SVA LPVA4 apresentou maior título ($1x10^{7,7}TCID_{50}$/50µL) em relação ao isolado CR006/19 ($1X10^{5,5}TCID_{50}$/50µL) do LFDA-MG, sendo também observado maior intensidade do efeito citopático em um menor período de incubação do primeiro frente ao segundo. No inóculo SVA LPVA4 era notado o arredondamento celular associado à lise de 90% da monocamada celular (Figura 13A) entre 48-72 horas de incubação, enquanto no outro era observado o arredondamento celular com ocorrência de lise em cerca de 40-50% da monocamada após 96 horas de incubação. Não foi observado ECP nos controles negativos (Figura 13B).

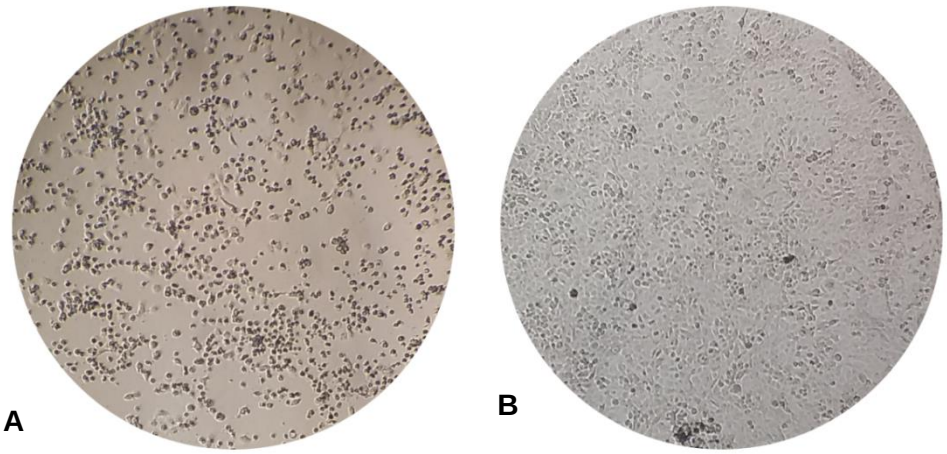

Figura 13 – A: Efeito citopático característico do SVA LPVA 4 – arredondamento celular e destruição da monocamada; B: Controle negativo – monocamada íntegra de células NCI- H1299. Fonte: Arquivos pessoais.

5.2 Titulação Viral

Após a multiplicação do SVALPVA4 em células da linhagem NCI-H1299, o título do vírus utilizado no desenvolvimento das técnicas de IPMC e SN foi de $2x10^{9,42}$ $TCID_{50}$/mL.

5.3 Cinética de Replicação Viral

A cinética de replicação viral foi realizada com três concentrações do vírus (0.1, 1 e 10 MOI) coletadas em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Os resultados encontrados demonstram que o vírus se replica eficientemente em células da linhagem NCI-H1299 (Yang *et al*., 2012; Pinheiro de Oliveira, 2019), com a concentração máxima do título viral sendo detectada 72 horas pós-inoculação (h.p.i.) em 0.1 MOI (Joshi *et al*., 2016), 48 h.p.i. em 1 MOI

e 24 h.p.i. em 10MOI (Gráfico 1). Do mesmo modo que outros membros da família *Picornaviridae*, o SVA também apresenta um rápido ciclo de replicação, sendo detectados títulos de 10^4TCID$_{50}$/50µL em quatro horas pós-inoculação (Yang *et al.,* 2018).

A multiplicidade de infecção (MOI) consiste na correlação entre a quantidade de partículas virais e o número de células hospedeiras em um determinado meio de infecção (Abedon & Bartom, 2013). Por isso, a avaliação da cinética de replicação do isolado SVA LPVA4 foi utilizada para orientar na escolha das concentrações inicias de vírus a serem utilizadas e nos períodos de incubação mais adequados, tendo em vista que para o desenvolvimento do teste de IPMC dois parâmetros têm de ser considerados, o título viral e a confluência da monocamada. Uma vez que é esperado que as células sejam infectadas, mas sem destruição completa da monocamada. Por isso, foi observado que as concentrações de 0.1 MOI e 1 MOI no período de 48 a 72 horas eram as mais adequadas para o desenvolvimento do teste de IPMC (Figura 12).

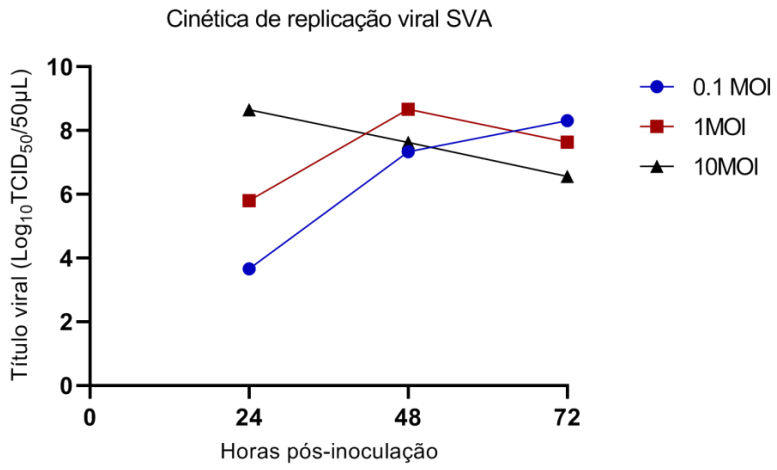

Figura 14 – Avaliação da cinética de replicação do isolado SVA LPVA4 em células da linhagem NCI-H1299 inoculadas com diferentes concentrações de vírus 0.1MOI, 1 MOI e 10MOI em três tempos de incubação 24, 48 e 72 horas.

5.4 Desenvolvimento da Imunoperoxidase em Monocamadas de Células (IPMC)

De acordo com os testes realizados para o desenvolvimento da técnica de IPMC para detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A* em amostras de soro de suíno a concentração celular mais apropriada foi de 3,65X10^4 cél/cm^2 da linhagem NCI-H1299, infectadas com 0,1MOI do isolado SVA LPVA4, mantidas na estufa de CO_2 durante 64 horas. Para determinação do intervalo de incubação ideal, foi observado o equilíbrio entre o ECP e a manutenção da monocamada celular (Gerber *et al*., 2011). As amostras de soro foram diluídas na solução de bloqueio composta por PBS-Tween 20 0,05% com 1,5% de leite em pó desnatado, com a qual foi observada redução da marcação inespecífica no fundo da placa. O anticorpo anti-IgG suíno conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich SAB 3700427-2) na diluição

1:100 foi utilizado devido a maior afinidade com anticorpo primário. Deste modo, foi definido o protocolo do método de IPMC para SVA posteriormente, utilizado na verificação de desempenho em relação à soroneutralização.

A leitura das placas foi realizada no microscópio óptico de luz invertida. Nas amostras de soro positivas foi observada marcação rosa específica no citoplasma das células infectadas principalmente, nas quais apresentavam aspecto arredondado (Figura 14A). No entanto, nas maiores diluições do soro, como 1:1280, era notada a redução da intensidade da coloração, por isso, nesses casos é recomendada que a leitura seja realizada no aumento de 40X. Os soros negativos não demonstraram alteração de cor na monocamada (Figura 14B). Desta forma, foi demonstrado que o teste de Imunoperoxidase em Monocamada Celular foi capaz de diferenciar soros positivos e negativos, além de permitir a obtenção do título de anticorpos nessas amostras.

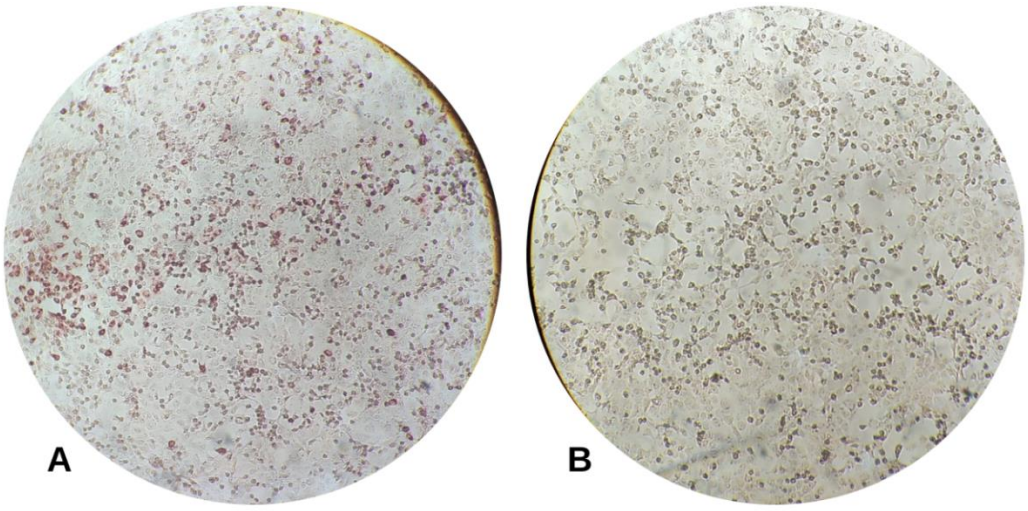

Figura 15 – A: Marcação rosa específica no citoplasma das células observada na amostra de soro suíno positivo; B: Ausência de coloração observada nas amostras de soro negativo. Fonte: Arquivo Pessoal.

5.5 Comparação entre os testes de Soroneutralização e IPMC

Ainda não há relatos na literatura de testes de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) para detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A*. Apesar de pouco difundida, a técnica já é utilizada para o diagnóstico indireto de doenças infecciosas virais como varíola bovina, circovirose suína, arboviroses em humanos, e também doenças bacterianas, como a enteropatia proliferativa suína causada por *Lawsonia intracellularis* (Soliman *et al.,* 1997; Guedes *et al*., 2002; Gerber *et al*., 2011; Gerber *et al*., 2012).

Dentre as vantagens da utilização do teste de IPMC é importante ressaltar características como a facilidade de execução, a não exigência de infraestrutura laboratorial muito sofisticada, e a possibilidade escalonamento do método, devido ao armazenamento das placas previamente preparadas, a -20°C por até três meses (Soliman *et al*., 1997; Gerber *et*

al., 2012). Além disso, a técnica dispensa o pré-tratamento térmico (56°C/30min) dos soros, e pode facilmente ser adaptada para detecção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, como IgM e IgG, apenas com a mudança do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Direksin *et al*., 2002; Gerber *et al*., 2011).

A investigação do perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 por meio da técnica de IPMC foi realizada em oito granjas brasileiras. Neste estudo, foram testadas 240 amostras de soro, que demonstraram baixos, médios e altos títulos de anticorpos contra o PCV2, detectados em animais de diferentes categorias em rebanhos com e sem sinais clínicos. Desta forma, foi possível acompanhar o período em que ocorreu a queda de anticorpos maternos e a soroconversão dos animais, demonstrando que avaliação soroepidemiológica com o teste de IPMC constitui uma importante ferramenta para tomada de decisões na granja, como por exemplo, a determinação do calendário vacinal (Barbosa *et al*., 2008).

Direksin *et al*. (2002) demonstraram que o método de IPMC foi capaz de detectar anticorpos contra o vírus Influenza A suíno (SIV), cerca de quatro dias antes do teste de Inibição da Hemaglutinação (HI), em amostras de animais experimentalmente infectados. Apesar de não permitir a diferenciação dos anticorpos contra os diferentes subtipos do vírus, como no HI, o IPMC se mostrou um método indireto eficiente para o diagnóstico de SIV na granja. Além de apresentar vantagens como dispensar o pré-tratamento do soro e o uso de hemácias recentemente coletadas.

Para o diagnóstico do SVA estão disponíveis os testes de soroneutralização (SN), ensaio de absorção imunoenzimático competitivo (cELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) para o diagnóstico do SVA. Goolia *et al.,* 2017 observou valores Kappa entre 0,82 a 0,95 que indicam que houve alta concordância entre os testes entre a SN, o cELISA e o teste de IFI utilizado como referência. Neste estudo, foram obtidos especificidade e sensibilidade 98.2% e 96.9% (cELISA), e 99.6% e 98.2% (SN), respectivamente.

Neste experimento, as amostras de soro negativas utilizadas na validação dos testes tinham duas origens, suínos livres de patógenos específicos (SPF) e rebanhos sem histórico de doença vesicular. Já as positivas foram obtidas de fontes variadas, suínos experimentalmente infectados com SVA, soro com altos títulos de anticorpos neutralizantes, previamente testados em protocolos de SN anteriormente descritos, além de amostras de rebanho onde foi relatado surtos de doença vesicular associada ao SVA, previamente avaliados em IFI (Goolia *et al.,* 2017).

No presente trabalho, durante o desenvolvimento dos métodos de diagnóstico foram utilizadas oito amostras de soro padrão, sendo quatro amostras negativas e quatro amostras positivas. Na SN os títulos dos soros positivos foram >1024, 1:512, 1:256, 1:256 e os negativos <1:16, e no IPMC 1:320, 1:320, 1:80, 1:80 e <1:20, respectivamente. Em estudos de avaliação da resposta imune adaptativa contra o SVA foram identificados anticorpos IgM a

partir do 5° dia pós-infecção e IgG desde o 7° d.p.i. Durante a fase aguda da doença a classe IgM foi altamente correlacionada aos elevados níveis de NA presentes no soro. No entanto, após a resolução dos sinais clínicos foi sugerido que o isotipo IgG seja responsável pela neutralização viral (Maggioli *et al*., 2018).

Dessa forma, o valor inferior do título de anticorpos observado no teste de IPMC em relação a SN pode ter ocorrido, pois de acordo com o momento da coleta do soro, teremos primeiramente, maior detecção de NA da classe IgM demonstrando títulos mais elevados na SN, do que no IPMC no qual foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG suína. Bem como foi observado por Direksin *et al*. (2002) que obteve baixa concordância (Kappa = 0,42) entre os testes de IPMC e HI para detecção de anticorpos contra o vírus Influenza (H1N1) possivelmente, devido a capacidade de cada método em detectar diferentes isotipos de imunoglobulinas.

Posteriormente, para a verificação do desempenho da técnica de IPMC frente ao teste de referência, foram testadas 50 amostras em duplicata de soro suíno, provenientes de granjas com suspeita de doença vesicular, enviadas ao LFDA-MG. No entanto, o *status* sorológico desses rebanhos era desconhecido, e possivelmente, foram feitas coletas em diferentes fases da infecção. Por isso, foram observadas diferenças entre os resultados obtidos no teste de SN e IPMC, representados nas figuras 14 e 15, respectivamente.

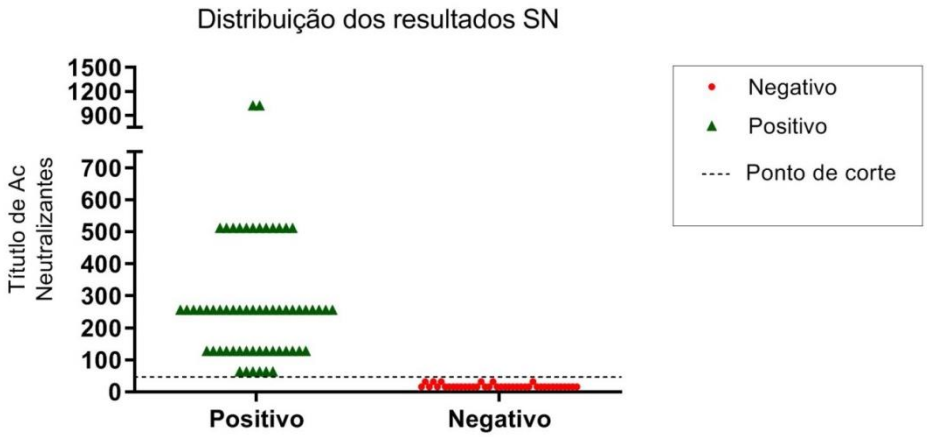

Figura 16 – Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos no teste de SN, considerando o ponto de corte de 1:64.

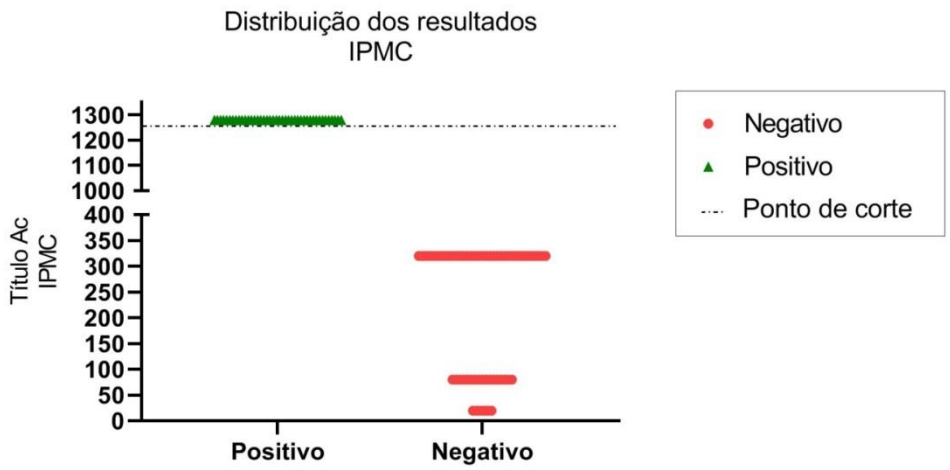

Figura 17 – Distribuição dos resultados do teste de IPMC. As amostras com título de ≥1:1280 foram consideradas positivas como determinado pelo índice de Youden, com base nos resultados obtidos no teste de referência (SN).

Para comparação dos resultados obtidos (Tabela 2) em ambos os métodos foi emprega a estatística Kappa de Cohen, que resultou em baixa concordância entre o IPMC e a SN – 0,22 ($p<0,01$), apesar de estatisticamente significativa.

Tabela 2 – Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de IPMC e SN das 100 amostras de soro suíno.

Resultados IPMC	Resultados SN		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	30	12	42
Negativo	28	30	58
Total	58	42	100

Níveis de baixa concordância entre métodos de diagnóstico também foram observados por Dvorak *et al*. (2017) num estudo de validação do teste ELISA indireto, em comparação com a imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos IgG contra o SVA. Neste estudo as amostras de soro positivo foram obtidas a partir da coleta de 34 matrizes que apresentavam sinal clínico de doença vesicular, com confirmação do diagnóstico de infecção causada pelo SVA. Os soros foram coletados nos dias 0, 4, 11,18, 25, 39, e 60 após o início das lesões e as amostras negativas eram provenientes de matrizes e leitões de terminação de rebanhos sem evidência prévia de doença vesicular.

Dvorak *et al*. (2017) observaram concordância 89% nas amostras negativas, enquanto nas positivas houve variação de 73 a 100% na concordância dos resultados ao longo do período de tempo avaliado. No entanto, a maior discordância entre os métodos foi

demonstrada no dia 0, em que os sinais clínicos foram identificados pela primeira vez, com amostras positivas no ELISA, expressando resultado negativo ou suspeito na IFI, o que gerou valor de concordância de 40%. Esse aspecto reforça a possibilidade de haver discordância entre testes de diagnóstico de acordo com a fase da infecção pelo *Senecavirus A.*

Além disso, o desempenho do IPMC foi determinado pela análise da curva de ROC (Figura 16), sendo observada área sob a curva (AUC) de 0.601 (IC95% 0.495 a 0.706). Esse parâmetro está relacionado com a capacidade do teste em discriminar resultados positivos e negativos, em relação a SN (Lopes *et al*., 2014). O valor de AUC encontrado reforça a concordância de 60% demonstrada na avaliação do coeficiente kappa. Dessa forma, neste estudo, o teste de IPMC demonstrou ter menor eficiência em detectar verdadeiros-positivos e falsos-positivos com base nos resultados obtidos na soroneutralização.

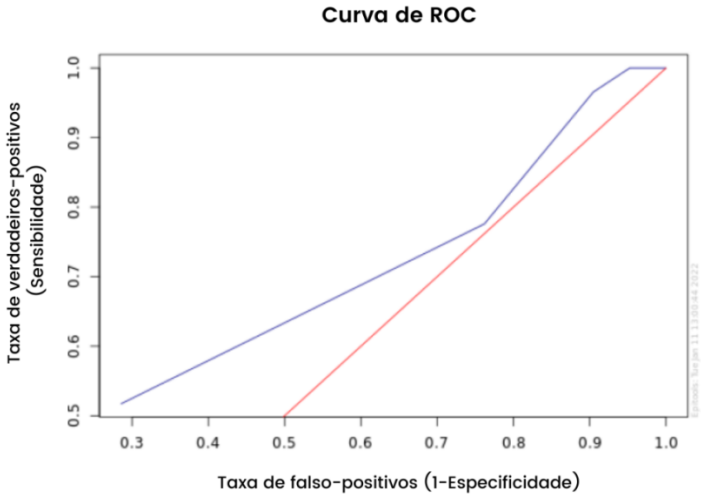

Figura 18 – Curva de ROC com representação área sob a curva (AUC).Fonte: Sergeant, ESG, 2018. Ausvet.

O índice de Youden também foi empregado como ferramenta de verificação da acurácia global do IPMC. Essa análise, auxilia na determinação do ponto de corte mais apropriado para o novo método, considerando os valores máximos de especificidade e sensibilidade que podem ser obtidos (Smirts, 2010) em relação ao teste de referência. Deste modo, o valor de título de anticorpos de 1:1280 foi definido como o melhor ponto de corte para o IPMC, com sensibilidade e especificidade de 51% e 71%, respectivamente, frente a técnica de soroneutralização (Figura 17).

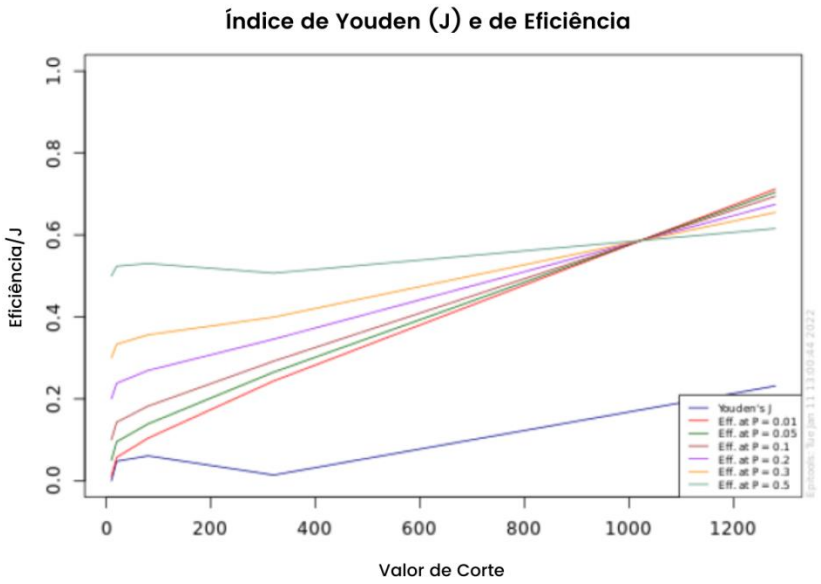

Figura 19 – Avaliação da eficiência do teste de IPMC pela estatística de Youden. Fonte: Sergeant, ESG, 2018. Ausvet.

As diferenças nos resultados da SN e do IPMC provavelmente foram observadas devido à capacidade de detecção de diferentes isotipos IgM e IgG entre os métodos, visto que a infecção por *Senecavirus A* acarreta uma rápida resposta imune humoral com elevação de anticorpos neutralizantes da classe IgM, e posterior aumento do isotipo IgG (Maggioli *et al.,* 2018). O teste de IPMC desenvolvido no presente estudo para detecção do isotipo IgG, devido ao tipo de anticorpo secundário utilizado. Diante disso, a utilização do IPMC, como teste único em amostragem por conveniência não se mostrou uma ferramenta interessante para detecção eficiente de anticorpos contra o *Senecavirus A.* Nesses casos, em que não se conhece o histórico epidemiológico da população avaliada e diante das características da resposta imune frente a infecção pelo SVA, a associação de métodos de diagnóstico se mostra como uma alternativa mais eficiente para a detecção de anticorpos contra o SVA (Houston *et al*., 2020).

Apesar de ter sido verificado menor desempenho da imunoperoxidase em monocamada celular em relação a soroneutralização, a maior facilidade de execução da técnica, a possibilidade de armazenamento das placas por até três meses e o menor custo reforçam as vantagens do novo método. Em vista disso, estudos com amostras mais bem estabelecidas e em maior quantidade devem ser novamente avaliadas, para verificação da performance do IPMC em um novo cenário.

6. CONCLUSÃO

As técnicas de soroneutralização e IPMC foram desenvolvidas e demostraram eficiência na detecção de anticorpos contra o SVA, sendo possível discriminar resultados positivos e negativos. No entanto, o teste de IPMC apresentou baixo desempenho em relação

ao método de referência, quando utilizado em amostras soro coletadas em rebanhos com histórico soroepidemiológico desconhecido, e em diferentes fases da infecção pelo *Senecavirus A*. Por isso, é necessário que novas avaliações do método sejam refeitas em amostras de soro cujo período de coleta esteja bem determinado, além do conhecimento acerca do histórico do rebanho, para que possamos verificar a influência das diferentes fases da infecção por SVA nos resultados obtidos pelos métodos de IPMC e SN. Em vista disso, até o momento é recomendada a utilização do teste de IPMC em associação com outros métodos indiretos para avaliação do perfil sorológico de rebanhos com histórico desconhecido.

7. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PLLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 8ª ed. Elsevier. 2015.
2. ABEDON, S.T. & BARTOM, E. Multiplicity of Infection. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics:* Elsevier. *2° Ed.* p. 509-510. 2013.
3. ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2020. Disponível em:https://abpabr.org/wpcontent/uploads/2020/05/abparelatorioanual2020portugueseb.pdf. Acesso em: 18/01/2022.
4. ARZT, J.; BERTRAM, M. R.; VU, L. T. et al. First Detection and Genome Sequence of Senecavirus A in Vietnam**.** *Microbiology Resource Announcements*. v.8(3), 2019.
5. BAI, M.; WANG, R.; SUN, S. et al. Development and validation of a competitive ELISA based on virus‑like particles of serotype *Senecavirus* A to detect serum antibodies. *AMB Express.* v.11(7), p.1-8. 2021.
6. BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; MARTINS, N.R.S.; NASCIMENTO, E. F. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* v.60, n.4, p.815-820, 2008.
7. BAKER, K.L.; MOWRER, C.; LINHARES, D.C.L. et al. Systematic Epidemiological Investigations of Cases of *Senecavirus A* in US Swine Breeding Herds. *Transboundary and Emerging Diseases*. v.64. p. 11-18.2016.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Manual de Investigação de Doença Vesicular. Brasília*. 1ªed. 2020.
9. BUCKLEY, A.C.; MICHAEL, D.D.; FAABERG, K.S. et al. Comparison of historical and contemporary isolates of *Senecavirus A*. *Veterinary Microbiology*. v.253. 2021.
10. CASTANHO, M.J.P.; YAMAKAMI, A.; BARROS, L.C. et al. Avaliação de um teste em medicina usando uma curva ROC *fuzzy. Biomatemática*. v.14. p.14-28. 2004.
11. CAO, L.; ZHANG, R.; LIU, T. et al. Seneca Valley virus attachment and uncoating mediated by its receptor anthrax toxin receptor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S A*. v.115 (51). p. 13087-13092. 2018.
12. CASERTA, L.C.; NOLL, J.C.G.; SINGREY, A. et al. Stability of *Senecavirus A* in animal feed ingredients and infection following consumption of contaminated feed. Transboundary and Emerging Diseases, p. 1-9, 2021.
13. COHEN J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. v.20. p.37– 46. 1960.
14. DALL AGNOL, A. M., OTONEL, R. A., LEME, R. A. et al. A TaqMan-based qRT-PCR assay for *Senecavirus* A detection in tissue samples of neonatal piglets. *Molecular and Cell Probes*. v.*33*. p.28–31. 2017.
15. DALY, L.E.; BOURKE, G.J. Interpretation and Uses of Medical Statistics. 5° ed. Oxford, England: *Blackwell Science*. 2000.
16. DIREKSIN, K; JOO, J.; GOYAL, S. An immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 14. p. 169-171. 2002.
17. DONNER A, ELIASZIW, M. Goodness-of-fit approach to inference procedures for the kappa statistic: confidence interval construction, significance-testing and sample size estimation. *Statistics in Medicine*. v.11. p. 1511–1519. 1992.
18. DOTZAUER, A.; KRAEMER, L. Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: An overview. *World Journal of Virology*. v.1(3), p.91-107. 2012.

19. DVORAK, C.M.; AKKUTAY-YOLDAR, Z.; STONE, S.R. et al. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to *Senecavirus A* in swine. *BMC Vet. Res*. v.13 (1). 2017.
20. EVANS, D.J.; WASINGER, A.M.; BREY, R.N. et al. Seneca Valley virus exploits TEM8, a collagen receptor implicated in tumor growth. *Frontiers in Oncology*. v.8. p. 506. 2018.
21. EMBRAPA Suínos e Aves. 2021. Disponível: https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo. Acesso em: 08/11/2021.
22. FERNANDES, M.H.V.; MAGGIOLI, M.F.; JOSHI, L.R. et al. Pathogenicity and cross-reactive immune responses of a historical and a contemporary *Senecavirus A* strains in pigs. *Virology*. v.522, p.147–157. 2018.
23. FERONATO, C., LEME, R. A., DINIZ, J. A. 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.
24. FLORES, E.F. Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas. 3° ed. Santa Maria. Editora: UFSM. 2017.
25. GENEBANK. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=senecavirus. Acesso em: 11/01/2022.
26. GERBER, P.F.; GARROCHO, F.M.; LANA, A.M.Q.; LOBATO, Z.I.P. Serum antibodies and shedding of infection of porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *The Veterinary Journal.* London. England. v.188. p.240-242. 2011.
27. GERBER, P. F.; MATOS, A.C.D.; GUEDES, M.I.M.C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-Vaccinia virus antibody titration. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 24. p. 355-358. 2012.
28. GIMENEZ-LIROLA L.G.; RADEMACHER, C.; LINHARES, D. et al. Serological and molecular detection of *Senecavirus A* associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality. *Journal of Clinical Microbiology*. v.54 (8). p. 2082-2089. 2016.
29. GOOLIA, M. VANNUCCI, F; YANG, 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.* 2017. v.29. p.250-253.
30. GORBALENYA, A. E.; HOVI, T.; KNOWLES N. J. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*. *Journal of General Virology*. v.98. p.2421–2422. 2020.
31. GREINER, M., PFEIFFER, D., AND SMITH, R. D. Principals and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine.* v.45, p.23–41. 2000.
32. GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C.J.; DEEN, J.; WINKELMAN, N.L. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diagn Invest*. v.14, p.528–530. 2002.
33. GUO, B.; PIÑEYRO, P.E.; RADEMACHER, C.J.; ZHENG, Y. et al. Novel *Senecavirus A* in swine with vesicular disease, United States, July 2015. *Emerging Infect. Dis*. v.22 (7), p.1325–1327. 2016.
34. HALES, L. M.; KNOWLES, N.J.; REDDY, P.S. et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *Journal of General Virology*. v.89. p.1265–1275. 2008.
35. HAUSE, B.M.; MYERS, O.; DUFF, J. et al. *Senecavirus A* in Pigs, United States, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. v. 22(7), p. 1323-1325, 2016.

36. HEMATIAN, A.; SADEGHIFARD, N.; MOHEBI, R. et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspectives*. v.7. p. 77–82. 2016.
37. HOLE, K.; AHMADPOUR, F.; KRISHNAN, J. et al. Efficacy of accelerated hydrogen peroxide((R)) disinfectant on foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus and *Senecavirus A. Journal Appl. Microbiol*. v.122 (3), p.634–639. 2017.
38. HOUSTON, E.; GIMENEZ-LIROLA, L.G.; MAGTOTO, R. et al. Seroprevalence of *Senecavirus A* in sows and grower-finisher pigs in major swine producing-states in the United States. *Prev. Vet. Med*. v.165. p. 1–7. 2019.
39. HOUSTON, E.; TEMEEYASEN, G.; PIÑEYRO, P. E. Comprehensive review on immunopathogenesis, diagnostic and epidemiology of *Senecavirus A*. *Virus research.* v.286. p.1-9. 2020*.*
40. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2021. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ . Acesso em: 28 dezembro de 2021.
41. JOSHI, L. R.; FERNANDES, M. H.; CLEMENT, T. et al. Pathogenesis of *Senecavirus A* infection in finishing pigs. *Journal of General Virology.* 2016a. v.97. p.3267–3279.
42. JOSHI, L. R.; MOHR, K. A.; CLEMENT, T. et al. Detection of the emerging picornavirus *Senecavirus A* in pigs, mice, and houseflies. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 54. p.1536-1545. 2016b.
43. KNOWLES, N. J. HALES, L. M.; JONES, B. H. et al. Epidemiology of seneca valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. EUROPIC: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren. 2006.
44. KNOWLES, N.J. AND HALLENBECK, P.L. A new picornavirus is most closely related to cardioviruses. EUROPIC 2005: XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Lunteren, The Netherlands, 2005.
45. LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. v.33, p.671–679.1977.
46. LAGUARDIA-NASCIMENTO, M.; GASPARINI, M.R.; SALES, E.B. et al. Molecular epidemiology of *Senecavirus A* associated with vesicular disease in pigs in Brazil. *The Veterinary Journal.* v. 216. p. 207–209. 2016.
47. LEME, R. A.; ZOTTI, E.; ALCÂNTARA, B. K. et al. *Senecavirus A:* An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds. *Transboundary and Emerging Diseases*. v. 62. p. 603-611. 2015.
48. LEME, R. A., OLIVEIRA, T. E., ALFIERI, A. F. ET AL. Pathological, immunohistochemical and molecular findings associated with *Senecavirus A*-induced lesions in neonatal piglets. *Journal of Comparative Patholology*, v.*155*, p.145–155. 2016.
49. LEME, R. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Update on *Senecavirus* Infection in Pigs. *Viruses*. v. 9(7). 2017.
50. LEME, R.A.; MIYABE, F.M.; DALL AGNOL, A.M. et al. A new wave of *Seneca Valley virus* outbreaks in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases.* v.66, p.1101–1104. 2019.
51. LIU, C.; LIU, T.; LI, X. et al. Pathogenicity Analysis of Weaned Piglets Challenged With Novel Emerging *Senecavirus A* in Fujian, China. *Frontiers in Veterinary Science.* v.8. p.1-6. 2021.
52. LIU, T.; LI, X.; WU, M. et al. *Seneca Valley Virus* 2C and 3Cpro induce apoptosis via mitochondrion-mediated intrinsic pathway. *Frontiers in Microbiology*. v.10. p1-12. 2019.
53. LOPES, B.; RAMOS, I.C.O.; RIBEIRO, G. et al. Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. *Rev Bras Oftalmol.* v.73 (1), p. 16-22. 2014.

54. MACLACHALN, N. J. *Picornaviridae*. Fenner's Veterinary Virology. 4ª ed. London: Academic Press: Elsevier. p. 426-440. 2011.
55. MAES, R.K.; LANGOHR, I.M.; WISE, A.G., SMEDLEY R.C., THAIWONG, T.; KIUPEL, M. Beyond H&E: integration of nucleic acid-based analyses into diagnostic pathology. *Veterinary Pathology.* v. 51. p. 238-256. 2014.
56. MAGGIOLI, M. F.; LAWSON, S.; DE LIMA, M. et al. Adaptive Immune Responses following *Senecavirus A* Infection in Pigs. *Journal of Virology*. v.92. p. 1-17. 2018.
57. MAGGIOLI, M.F.; FERNANDES, M.H.V.; JOSHI, L.R. et al. Persistent infection and transmission of *Senecavirus A* from carrier sows to contact piglets. *Journal of Virology*. v.93 (21). p.1-19. 2019.
58. MEDINA, F.; MEDINA J. F.; CÓLON, C. et al. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*. v.27. 2012.
59. METZ, E.C. Basics principles of roc analyzes. *Seminars in Nuclear Medicine.* v.8, p. 283-297. 1978.
60. MILES, L.A.; BURGA,L.N.; GARDNER, E.E.; et al. Anthrax toxin receptor 1 is the cellular receptor for Seneca Valley virus. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 127 (8). p. 2957-2967. 2017.
61. MU, S.; SUN, S.; DONG, H. et al. Potent protective immune responses to *Senecavirus* induced by virus-like particle vaccine in pigs. *Vaccines*. v.8(3), p.1-13, 2020.
62. MULLER, M; FARIA, V.B.; MACHADO, S.A. et al. *Senecavirus A* (SVA) in finishing swine: diagnosis and viral isolation. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.50(7). 2020.
63. OIE – World Organisation for Animal Health. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. 2019. Acesso em: 13/12/2021.
64. OIE – World Organisation for Animal Health. *Terrestrial Manual 2021: African swine fever (infection with African swine fever virus).* Disponível em: https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/. 2021. Acesso em: 15/04/2022.
65. OLIVEIRA, T. E. S.; LEME, R.A.; DALL AGNOL, A. M. et al. *Seneca Valley virus* induces immunodepression in suckling piglets by selective apoptosis of B lymphocytes. *Microbial Pathogenesis.* v.158. 2021.
66. PASMA, T.; DAVIDSON, S.; SHAW, S. L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal*. v.49. p.84-85. 2008.
67. PINHEIRO-DE-OLIVEIRA, T.F., FONSECA-JUNIOR, A.A., CAMARGOS, M.F. et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR to identify the emerging vesicular virus *Senecavirus A* in biological samples. *Transbound Emerg.Dis*. v.66 (3), p.1360–1369. 2019.
68. QIAN, S.; FAN, W.; QIAN, P. et al. Isolation and full-genome sequencing of *Seneca Valley virus* in piglets from China, 2016. *Virology Journal.* v. 13. 2016.
69. RACANIELLO, V.R; Picornaviridae: The viroses and their Replication. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer, 2007.
70. REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg*. v.27, p.493–49. 1938.
71. REIS, R.; REIS, A. Fundamentos teóricos e aplicação prática da biosseguridade na produção de suínos. *Associação Brasileira de Criadores de Suínos.* 1ª ed. Brasília. 2014.

72. RESENDE, T.P.; MARTHALER, D.G.; VANNUCCI, F.A. A novel RNA-based in situ hybridization to detect *Seneca Valley virus* in neonatal piglets and sows affected with vesicular disease. *PLoS One*. v.12 (4). 2017.
73. ROUSTON, C.; ZHANG, J.; SCOTT, J. et al. Efficacy of ultraviolet C exposure for inactivating *Senecavirus A* on experimentally contaminated surfaces commonly found on swine farms. *Veterinary Microbiology*. v. 256. p.1-8. 2021.
74. SAENG-CHUTO, K.; RODTIAN, P.; TEMEEYASEN, G. et al. The first detection of *Senecavirus A* in pigs in Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*. v.65(1), p. 285-288. 2018.
75. SAPORITI, V. ;FRITZEN, J.T.T.; FERONATO,C. 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. p. 317-32. 2017.
76. SATTAR, S.A. Hierarchy of Susceptibility of Viruses to Environmental Surface Disinfectants: A Predictor of Activity Against New and Emerging Viral Pathogens. *Journal Of Aoac International*. v. 90(6). p. 1655-1658. 2007.
77. SEGALÉS, J.; BARCELLOS, D.; ALFIERI, A. et al. *Senecavirus A*: An Emerging Pathogen Causing Vesicular Disease and Mortality in Pigs. *Veterinary Pathology*.v. 54(1). p. 11–21, 2017.
78. SHARMA, B.; FERNANDES, M. H.V.; DE LIMA, M.; JOSHI, L. R. *et al*. A Novel Live Attenuated Vaccine Candidate Protects Against Heterologous *Senecavirus A* Challenge. *Frontiers in Immunology*. v. 10. 2019.
79. SINGH, A., MOR, S.K., ABOUBAKR, H., VANNUCCI, F. et al. Efficacy of three disinfectants against Senecavirus A on five surfaces and at two temperatures. *Journal of Swine Health and Production*. v.25 (2). p. 64–68. 2017.
80. SMITS, N. A note on Youden's J and its cost ratio. *BMC Medical Research Methodology.* v.10. 2010.
81. SOLIMAN, A. K.; WATTS, D. M.; SALIB, A. W. et al. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. *Journal of Virological Methods*. v. 65. p. 147-151.1997.
82. SUN, D.; VANNUCCI, F.; KNUTSON, T. P. et al. Emergence and whole-genome sequence of *Senecavirus A* in Colombia. *Transboundary and Emerging Diseases*.v. 64(5), p.1346-1349, 2017.
83. STUROS, M.; MURRAY, D.; REICKS, D. et al. Natural and experimentally induced *Senecavirus A* infections in boars. *Swine Health Information Center*. 2017.
84. VANNUCCI, F.A.; LINHARES, D.C.; BARCELLOS, D.E. et al. Identification and Complete Genome of *Seneca Valley Virus* in Vesicular Fluid and Sera of Pigs Affected with Idiopathic Vesicular Disease, Brazil. *Transbound Emerg Dis*. v.62, p.589-593. 2015.
85. VENKATARAMAN, S.; REDDY, S.P.; LOO, J. et al. Structure of *Seneca Valley Virus*-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus. *Structure.* v. 16(10). p. 1555–1561. 2008.
86. ZHANG, X.; ZHU, Z.; YANG, F. et al. Review of *Seneca Valley Virus*: A Call for Increased Surveillance and Research. *Frontiers in Microbiology.* v.9. 2018.
87. ZHANG, Z.; ZHANG, L.; ZHANG, F. et al. Retrospective surveillance for Senecavirus A in porcine samples in China from 2016 to 2018 (in Chinese). *China Anim Health Inspect*. v.36, p.1–6. 2019.
88. ZHU, Z.; YANG, F.; CHEN, P. et al. Emergence of novel *Seneca Valley virus* strains in China, 2017. *Transbound Emerg*. Dis. v.64(4), p.1024–1029. 2017.

89. WILLCOCKS, M. M.; LOCKER, N.; GOMWALK, Z. et al. 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(9). p. 4452–4461. 2011.
90. WU, Q.; ZHAO, X.; BAI, Y. et al. The First Identification and Complete Genome of Senecavirus A Affecting Pig with Idiopathic Vesicular Disease in China. *Transboundary and Emerging Diseases*. v. 64(5), p.1633-1640, 2017.
91. YANG, M.; VAN, B.R.; XU, W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca valley virus. *J Vet Diagn Invest*. v.24. p.42– 50. 2012.
92. YANG, F.; ZHU, Z.; CAO, W. *et al*. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs. *Vaccine.* v.36(6), p.841-846, 2018.
93. YANG, F.; ZHU, Z.; LIU, H. et al. Evaluation of Antibody Response in Sows after Vaccination with *Senecavirus A* Vaccine and the Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics in Offspring. *Vaccines.* v.9. 2021.
94. YOUDEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* v.3(1). p.32-35. 1950.

8. ANEXOS

Anexo 1 – PROCESSO Nº 21181.000083/2021-69. INFORMAÇÃO Nº 20/DIFA/CAT/CGSA/DSA/SDA/MAPA. Acordo do LFDA-MG com o projeto de "Verificação de desempenho da técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células para detecção de anticorpos contra o *Senecavirus A* em amostras de soro de suínos" sob responsabilidade da professora Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes.

02/02/2021 SEI/MAPA - 13736935 - Informação

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE SAUDE ANIMAL
COORDENACAO-GERAL DE SANIDADE ANIMAL
COORDENACAO DE ANIMAIS TERRESTRES
DIVISAO DE FEBRE AFTOSA E OUTRAS DOENCAS VESICULARES

INFORMAÇÃO Nº 20/DIFA/CAT/CGSA/DSA/SDA/MAPA
PROCESSO Nº 21181.000083/2021-69

INTERESSADO(A): DIFA

Assunto: Desenvolvimento e padronização de técnicas de imunodiagnóstico para o Senecavirus A em amostras de soro de suínos.

Senhor Coordenador da CAT

1. Essa Difa está de acordo com o projeto descrito no documento SEI 13563980 e na declaração descrita no documento SEI 13563980.

2. Solicitamos que a dissertação de mestrado, assim como as produções científicas produzidas a partir desse estudo, sejam inseridas neste processo.

Respeitosamente,

Documento assinado eletronicamente por **DIEGO VIALI DOS SANTOS**, **Chefe de Divisão**, em 01/02/2021, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,§ 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **13736935** e o código CRC **84FAD900**.

Referência: Processo nº 21181.000083/2021-69 SEI nº 13736935

https://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=25320386&in… 1/1

Anexo 2 – Protocolo de detecção de anticorpos para o *Senecavirus A* em amostras de soro pelo ensaio de neutralização viral.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA **Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MG** **Divisão Técnica Laboratorial - DLAB / Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais - LDDV/PL** **Método de Ensaio – MET**	**Código:** MET/LDDV/PL/063 - V.3 **Fase:** Vigente **Aprovado em:** 08/02/2019

Detecção de anticorpos para o Senecavirus A em amostras de soro pelo ensaio de neutralização viral

1.0 Objetivos e alcance
Este método objetiva avaliar a presença de anticorpos para o *Senecavirus A* (SVA) em amostras de soros pela técnica de neutralização viral.

2.0 Fundamentos
A pesquisa de anticorpos pelo método de neutralização viral tem como princípio a perda da infectividade viral para um determinado sistema celular mediante a presença de anticorpos específicos.

3.0 Reagentes, padrões, materiais e insumos
3.1 Reagentes e meio de cultura
- Meio essencial mínimo (MEM) (IP/PMC/PL/035).

3.2 Padrões
- Suspensão da linhagem celular NCI-H1299 contendo 225.000 células/mL e 5 % de soro fetal bovino;
- soros controle: reagente e não reagente o SVA;
- suspensão do SVA contendo 100 $TCID_{50}$/50 µL.

3.3 Materiais
- Algodão hidrófilo;
- bandeja de alumínio;
- caneta de retroprojetor;
- erlenmayer de 100 ou 250 mL;
- frascos para descarte;
- frascos tipo penicilina de 10 mL;
- microplaca de fundo plano de 96 poços para cultivo celular;
- pipetas volumétricas de 10 mL;
- ponteiras descartáveis;
- reservatórios para pipetagem com pipeta multicanal;
- tampas para frasco tipo penicilina.

4.0 Equipamentos
- Agitador magnético para tubos;
- banho maria 56 ºC ± 2 ºC;
- cabine de segurança biológica;
- estufa a 37 ºC ± 2 ºC com 5 % de CO_2;
- microscópio invertido;
- micropipetas monocanal e multicanal com volumes ajustáveis de 5 µL, 10 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL e 5 mL;
- pipetador automático;
- ultrafreezer.

5.0 Precauções analíticas
- As atividades serão realizadas em laboratório com nível 2 de biossegurança.

Aprovado por:	Marcelo Fernandes Camargos Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota
Verificado por:	Kelly Fagundes Nascimento
Elaborado/Revisado por:	Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

- Seguir as orientações prescritas no POP/LDDV/PL/002.

6.0 Procedimentos

Os procedimentos descritos neste método são baseados nas referências descritas no item 9 deste MET.
As amostras para diagnóstico sorológico recebidas pelo LDDV/PL devem ser submetidas aos procedimentos descritos no POP/LDDV/PL/001. As cepas de vírus devem ser utilizadas conforme descrito no POP/LDDV/PL/005. Após retirar as cepas do ultrafreezer, registrar no FOR/LDDV/PL/010.
Todos os registros relativos ao método devem ser realizados no FOR/LDDV/PL/013.
A critério do Responsável Técnico as amostras podem ser avaliadas com ou sem repetição (duplicata).

- Inativar as amostras em banho-maria a 56 ºC ± 2 ºC durante 30 minutos.

6.1 Método quantitativo

- Avaliar a toxidez apenas se o soro não tiver sido testado em outro ensaio de neutralização viral.
- Antes de pipetar as amostras de soro, homogeneizar com auxílio de agitador de tubos ou fazer movimentos de inverter os microtubos;
- Adicionar 93,75 µL de MEM e 6,25 µL de soro na linha A (controle de toxidez).
- Adicionar 87,5 µL de MEM e 12,5 µL de soro na linha B (diluição inicial 1/8 e final 1/16). Cada amostra de soro deve ser adicionada à uma coluna da placa;
- Adicionar 50 µL de MEM nas linhas C a H;
- Distribuir as amostras, controles e retrotitulação conforme o quadro 1.
- Homogeneizar as amostras e transferir 50 µL MEM/soro da linha B para C, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 50 µL.
- Em caso da toxidez já ter sido avaliada, iniciar o ensaio na linha A conforme descrito acima (Adicionar 87,5 µL de MEM e 12,5 µL de soro ...);

Quadro 1 – Localização das amostras, controles e retrotitulação na placa

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**Log**	Diluição
A	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	TX	TX
B	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,2	1/16
C	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,5	1/32
D	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,8	1/64
E	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,1	1/128
F	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,4	1/256
G	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,7	1/512
H	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	3,0	1/1.028
								RT						

- Preparar as colunas referentes aos controles conforme o item 6.2.

6.2 Controles

- Utilizar uma coluna para o soro controle negativo (CN) e uma coluna para o soro controle positivo (CP). Adicionar o MEM e os soros controle em cada uma das colunas conforme descrito no item 6.1, sem avaliação da toxidez;

Aprovado por:	Marcelo Fernandes Camargos Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota
Verificado por:	Kelly Fagundes Nascimento
Elaborado/Revisado por:	Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

- Para o controle de retrotitulação viral (RT), adicionar 50 µL de MEM nas três colunas destinadas à retrotitulação;
- Para o controle de células (CC), adicionar 100 µL de MEM. Reservar, pelo menos, uma coluna como controle de células. Nessa coluna não deve ser adicionado vírus ou soro.

6.3 Diluição de trabalho (DT) do vírus, incubação e adição da suspensão celular

- Utilizar um vírus de título conhecido titulado conforme IP/LDDV/PL/007. A partir do título, obter a diluição de trabalho (DT) diminuindo-se 10^2 do título. Exemplo: vírus com título de 10^6 deve ser diluído a 10^4 (ou seja 10.000 vezes). Preparar diluições em base 10 do vírus (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, etc.) até o obter a diluição de trabalho desejada, utilizando para o cálculo a fórmula Ci.Vi = Cf.Vf, onde:
- Ci = concentração inicial 10^{-1};
- Vi = volume inicial (volume de vírus a ser utilizado);
- Cf = concentração final = DT;
- Vf = volume final (volume necessário de vírus, para uma placa utilizar 5 mL);
- Exemplo: vírus com título de $10^{4,5}$. DT = $10^{2,5}$ = 1/316. Para 4 placas. Foram feitas duas diluições em base 10 (10^{-1} e 10^{-2});
- Ci.Vi = Cf.Vf;
- 1/100.Vi = 1/316.20
- Vi = 20.100/316 = 6,3 mL da diluição 1/100 (10^{-2}) e 13,7 mL de MEM;
- Registrar os cálculos da diluição no FOR/LDDV/PL/013;
- A partir da diluição de trabalho, preparar diluições 1/10 (10^{-1}), 1/100 (10^{-2}) e 1/1.000 (10^{-3}) utilizando MEM;
- Adicionar 50 µL da suspensão viral diluída (1/10, 1/100 e 1/1.000) em cada um dos poços das colunas destinadas à retrotitulação (uma coluna por diluição), começando pela suspensão mais diluída, desta maneira pode-se utilizar o mesmo reservatório e as mesmas ponteiras;
- Adicionar 50 µL da DT em todos os poços da placa, exceto nos destinados ao controle de toxidez, controle de células e retrotitulação.
- Incubar as placas em estufa a 37 ºC durante uma hora.
- Distribuir 100 µL de suspensão celular a 225.000 células/mL em todos os poços da placa, inclusive em todos os controles;
- Incubar as placas por aproximadamente 48 a 72 horas a 37 ºC;
- Realizar a leitura em microscópio invertido e registrar no FOR/LDDV/PL/013 utilizando:

  P para indicar presença de efeito citopático (ECP);
  N para indicar ausência de ECP;
  TX para indicar toxidez do soro;
  C para indicar contaminação.

7.0 Resultados

- Avaliar os resultados dos controles para considerar o ensaio válido;
- O título do soro controle positivo deve ter inserido na carta controle (PLN/LDDV/PL/037) e apresentar valores dentro da faixa esperada e que deve ser superior a 64 (1,8). Em caso de variação fora dos limites avaliar criticamente;
- O soro controle negativo deve apresentar título inferior a 64 (1,8);
- A quantidade de vírus deve estar entre 31,6 a 316 $TCID_{50}$.

Aprovado por:	Marcelo Fernandes Camargos Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota
Verificado por:	Kelly Fagundes Nascimento
Elaborado/Revisado por:	Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

7.1 Interpretação dos resultados

- Deve-se considerar como título, o inverso da diluição em que foi observada neutralização. Esses valores devem ser convertidos em log base 10;
- são considerados reagentes os soros em que houve de neutralização a partir do título 64 (1,8);
- nas exceções abaixo, podem ser considerados válidos os seguintes resultados:
- soros reagente (título maior ou igual 64 (1,8) em placas com mais de 316 TCID50;
- soros não reagentes (título inferior a 64 (1,8) em placas com menos de 31,6 TCID50;
- soros tóxicos: onde houve destruição das células por componentes do soro impedindo a interpretação do resultado;
- soros contaminados: soros em que houve presença de contaminação bacteriana ou por fungos impedindo a interpretação do resultado.

7.2 Transferência dos dados brutos e emissão do certificado de análise

- Os resultados devem ser emitidos como reagente, inconclusivo, não reagente, tóxico ou contaminado;
- incluir o título dos soros, entre parênteses, após descrição do resultado;
- registrar os resultados seguindo as instruções descritas na IT/LDDV/PL/095;
- conferir se os resultados foram transferidos corretamente para a o Sample Manager.

8.0 Responsabilidades

- Cabe ao responsável pelo LDDV/PL, seu substituto ou pessoa designada por ele, assegurar o treinamento deste MET para os analistas que irão executá-lo.
- Cabe a responsável pelo LDDV/PL ou seu substituto autorizar possíveis desvios do método, bem como justificá-lo tecnicamente e conferir se os dados brutos foram corretamente transferidos para o relatório de ensaio.
- Cabe ao responsável pelo LDDV/PL ou seu substituto a supervisão das análises realizadas no laboratório de forma a garantir a rastreabilidade e confiabilidade dos dados gerados.

9.0 Referências

Goolia M, Vannucci F, Yang M, Patnayak D, Babiuk S, Nfon CK. 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 2017, Vol. 29 (2) 250–253.

Joshi LR, Fernandes MHV, Clement T, Lawson S, Pillatzki A, Resende TP, Vannucci FA, Kutish GF, Nelson EA, Diel DG. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. Journal of General Virology (2016), 97, 3267–3279.

Saporiti V, Fritzen JTT, Feronato C, Leme RA, Lobato ZIP, Alfieri A, Alfieri AA. A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for *Seneca Valley virus* infection in major pig production states of Brazil. Vet Res Commun DOI 10.1007/s11259-017-9697-6.

Yang M, van Bruggen R, Xu W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Seneca Valley virus*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 24 (1) 42–50, 2012.

10.0 Documentos referenciados

Aprovado por:	Marcelo Fernandes Camargos Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota
Verificado por:	Kelly Fagundes Nascimento
Elaborado/Revisado por:	Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

IP/PMC/PL/035-Meio Essencial Mínimo (MEM) com Hepes
IT/LDDV/PL/095-Uso do Sample Manager
POP/LDDV/PL/001-Controle de amostras para análise e emissão de resultados
POP/LDDV/PL/005-Controle de cepas virais e soros de referência

11.0 Anexos referenciados
FOR/LDDV/PL/010-Registro de sementes, cepas e soros de referência
FOR/LDDV/PL/013-Acompanhamento da neutralização e titulação viral
PLN/LDDV/PL/037-Carta controle

12.0 Informações de registro
Acompanhamento da neutralização e titulação viral (FOR/LDDV/PL/013)
Carta controle (PLN/LDDV/PL/037)
Registro de sementes, cepas e soros de referência (FOR/LDDV/PL/010)

13.0 Arquivos anexados
Não aplicável

14.0 Controle de alterações
3.2 Diminuição na concentração de SFB.

Aprovado por:	Marcelo Fernandes Camargos Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota
Verificado por:	Kelly Fagundes Nascimento
Elaborado/Revisado por:	Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior