

ISOLAMENTO DO SENECAVIRUS A DE SUÍNOS NO BRASIL E SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA¹; LEONARDO CLASEN RIBEIRO¹;
DANIELLE GAVA²; REJANE SCHAFFER²; MARCELO DE LIMA³

¹Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com; leonardo.clasen@gmail.com

²Embrapa Suínos e Aves – danielle.gava@embrapa.br; rejane.schaefer@embrapa.br

³Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Senecavirus A* (SVA), inicialmente denominado *Seneca Valley Virus* (SVV), pertence ao gênero *Senecavirus* da família *Picornaviridae* (ICTV, 2020). O SVA possui genoma RNA de sentido positivo, com aproximadamente 7.310 nucleotídeos; não possui envelope e o capsídeo viral apresenta simetria icosaédrica (VENKATARAM et al., 2008). Os membros da família *Picornaviridae* são reconhecidos por possuírem uma das maiores taxas de substituição de nucleotídeos entre os vírus com genoma RNA (HICKS; DUFFY, 2011). Para o SVA, a ocorrência de mutações tem sido associada a um aumento da virulência, já que em estudos de infecção experimental pela cepa histórica SVV-001, os animais não apresentaram sinais clínicos (FERNANDES et al., 2018).

A primeira relação da infecção pelo SVA com o desenvolvimento de doença vesicular em suínos ocorreu em 2008 no Canadá (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008). Porém, somente a partir de 2014 o envolvimento do vírus na ocorrência de doença vesicular ganhou maior visibilidade devido ao relato de surtos em diversos países, principalmente, Brasil, China e Tailândia (LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2017).

A mortalidade é rara em animais adultos, porém, as manifestações clínicas como letargia, claudicação, anorexia, diarreia e lesões vesiculares ou ulcerativas na mucosa oral, focinho e patas ocasionam uma piora na conversão alimentar e queda no ganho de peso diário, diminuindo a rentabilidade da produção (JOSHI et al., 2016; MONTIEL, et al., 2016; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2018). Além das perdas produtivas, a impossibilidade de distinção clínica entre outras doenças vesiculares de suínos, incluindo febre aftosa (FMD), implica o envolvimento do Serviço Veterinário Oficial, restrição do trânsito de suínos, proibição de exportação de produtos cárneos e bloqueio no abate de animais com sinais vesiculares até que a possibilidade de infecções envolvendo outros agentes seja descartada.

Apesar disso, não há terapia específica e nem vacinas comercialmente disponíveis contra o SVA. Estudos com vacinas inativadas (YANG et al., 2018; BUCKLEY; LAGER, 2022), atenuadas (SHARMA et al., 2019) e VLPs (*viral-like particle*) (MU et al., 2020) desenvolvidos na China e nos Estados Unidos têm demonstrado a indução de resposta imunológica compatível com altos níveis de proteção em suínos frente a desafios homólogos e heterólogos. No Brasil, recentemente uma vacina inativada foi licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém, os dados de comprovação da eficiência da formulação não estão disponíveis na literatura.

Considerando as implicações da ocorrência de infecções pelo SVA nos rebanhos suínos, a necessidade de elaboração de estratégias de controle da circulação do patógeno e a escassez de dados acerca da evolução genética e

molecular do SVA no Brasil, sobretudo, a partir de 2016, o objetivo do presente trabalho foi realizar a reamplificação viral a partir de amostras de *Senecavirus A* isoladas em suínos no Brasil entre 2018 e 2021 e, selecionar, com base na distribuição geográfica e temporal, amostras representativas das cepas circulantes para posterior caracterização genética e seleção de um ou mais candidatos a serem usados em formulações vacinais.

2. METODOLOGIA

Um total de 291 isolados virais provenientes de amostras clínicas de suínos com diagnóstico positivo para *Senecavirus A* foram disponibilizadas pelo Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO – LFDA/MG. As amostras, provenientes de 41 cidades distribuídas em 8 estados brasileiros (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo) foram coletadas entre os anos de 2018 e 2021. O material foi enviado ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas em gelo seco. Após a chegada no laboratório, o material foi armazenado em ultrafreezer (-80 °C) até o momento do processamento.

Células da linhagem H1299 (*human non-small cell lung carcinoma cell*) foram utilizadas para o isolamento viral. As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina, estreptomicina e enrofloxacina) e antifúngico (anfotericina B). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa sob atmosfera com 5% de CO₂ até a monocamada celular atingir confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, 20 µL de cada amostra original (enviada pelo LFDA/MG) foram inoculados nas monocamadas semiconfluentes de células H1299 e incubadas por 1h a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Após o período de incubação, foi adicionado 0,5mL de meio RPMI-1640 por cavidade. Concomitantemente, cultivos celulares sem a adição das amostras virais foram utilizados como controle negativo. A cada 24h, os cultivos foram avaliados quanto a integridade da monocamada celular em microscópio invertido, verificando a formação do efeito citopático (ECP) resultante da multiplicação viral e característico do SVA. Após 72h pós-inoculação, todos os cultivos celulares foram congelados a -80 °C.

Um total de 52 isolados foram selecionados com base na distribuição geográfica e temporal. As amostras selecionadas tiveram a identidade confirmada por PCR e serão, posteriormente, submetidas ao sequenciamento viral pelo método de *Sanger*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento viral é uma técnica amplamente difundida na área de diagnóstico e pesquisa virológica por permitir a amplificação viral, muitas vezes necessária para realização de outras técnicas como caracterização antigênica, investigação de patogenicidade, produção de vacinas, dentre outros (FLORES, 2017). No presente estudo, o isolamento viral foi fundamental para realizar a amplificação viral, necessária para realização da caracterização genética que será realizada posteriormente. Após a inoculação em células H1299, das 291 amostras, 97,94% (285/291) apresentaram ECP característico da replicação viral nesta linhagem celular em até 72h pós-inoculação. A reação de RT-PCR confirmou a identidade do SVA.

Em relação a seleção, a Tabela 1 apresenta o total de amostras isoladas por estado e ano, bem como quais dessas foram selecionadas para posterior sequenciamento e caracterização. O total de amostras não foi definido com base em critérios pré-estabelecidos de modo que representasse estatisticamente o estado de origem, pois foram coletadas e cedidas pelo MAPA conforme a casuística. Sendo assim, das 285 amostras isoladas, 52 foram escolhidas com base em critérios de ano de coleta e distribuição geográfica. A seleção, embora não tenha sido feita com base estatística, contemplou amostras de oito estados (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo) onde houve coleta pelo LANAGRO – LFDA/MG nos anos de 2018 a 2021 o que possibilitará, a partir do sequenciamento pelo método de Sanger, uma caracterização molecular detalhada, permitindo o estudo posterior da evolução do SVA no Brasil no período.

Tabela 1: Amostras de *Senecavirus A* isoladas e selecionadas para sequenciamento por ano e estado.

ANO	ESTADO	ISOLADAS	SELECIONADAS
2018	Rio Grande do Sul	2	2
	Goiás	1	1
2019	Goiás	14	3
	Mato Grosso	7	3
	Paraná	13	6
	Minas Gerais	1	1
	Santa Catarina	1	1
	São Paulo	1	1
2020	Goiás	42	3
	Paraná	26	4
	Minas Gerais	3	2
	São Paulo	3	2
	Santa Catarina	1	1
2021	Goiás	92	6
	Paraná	56	7
	Mato Grosso do Sul	13	3
	Minas Gerais	6	1
	Santa Catarina	1	1
	São Paulo	1	1
	Rio Grande do Sul	4	3
TOTAL		285	52

A partir da avaliação e caracterização da similaridade de sequências genômicas pelo sequenciamento viral, tem sido possível o estudo das prováveis origens e distribuição do SVA. Em um estudo conduzido na China, foi observada similaridade genômica com os vírus isolados no Brasil, Canadá e Estados Unidos, demonstrando que a entrada do vírus na China pode ter ocorrido por diversas rotas (ZHANG et al., 2021). Além disso, considerando a taxa de mutação demonstrada por diversos trabalhos em outros países, a caracterização de amostras circulantes no Brasil pode auxiliar na elaboração de estratégias para controle do patógeno nos rebanhos suínos do país já que uma das perspectivas futuras do grupo é a elaboração de uma vacina que contemple uma ou mais cepas circulantes em território nacional.

4. CONCLUSÕES

O isolamento viral e a seleção de amostras para sequenciamento e caracterização genética constituem uma parte fundamental do projeto que possibilitará um conhecimento detalhado acerca da diversidade genética e evolução do SVA no Brasil a partir de 2018. Além disso, esses dados permitirão, no futuro, a seleção racional de cepas virais circulantes no país para o desenvolvimento de vacinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FERNANDES, M. H. V. 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.

FLORES, E. F. DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, cap. 11, p. 295-326, 2007.

HICKS, A. L.; DUFFY, S. Genus-Specific Substitution Rate Variability among Picornaviruses. **Journal of Virology**, v. 85, n. 15, p. 7942–7947, 2011.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**. 2020. Disponível em: <[https:// talk.ictvonline.org/taxonomy](https://talk.ictvonline.org/taxonomy)>. Acesso em 15 de agosto de 2022.

JOSHI L. R. et al. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **Journal of general virology**, v. 97, n. 12, p. 3267-3279, 2016.

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

MONTIEL N. et al. Vesicular disease in 9- week-old pigs experimentally infected with Senecavirus A. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 7, p. 1246, 2016.

MU, S. et al. Potent Protective Immune Responses to Senecavirus Induced by Virus-Like Particle Vaccine in Pigs. **Vaccines**, v. 8, n. 3 p. 532, 2020.

PASMA, T.; DAVIDSON, S.; SHAW, S. L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 1, p. 84–85, 2008.

SHARMA, B. et al. A Novel Live Attenuated Vaccine Candidate Protects Against Heterologous Senecavirus A Challenge. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

VENKATARAMAN, S. et al. Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus. **Structure**, v. 16, n. 10, p. 1555-1561, 2008.

YANG, F. et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs. **Vaccine**, v. 36, n. 6, p. 841–846, 2018.

ZHANG, J. et al. Genetic evolution and epidemiological analysis of Seneca Valley virus (SVV) in China. **Virus Research**, v. 291, p. 168–1702, 2 jan. 2021.

ZHANG, J.; GAUGER, P.; HARMON, K. Swine Influenza A Virus. In: LIU, D. (Ed.). **Molecular Detection of Animal Viral Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, p. 399– 406, 2016.