

ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Senecavirus A* EM FLUÍDO ORAL DE SUÍNOS

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA¹; DANIELLE GAVA²; REJANE SCHAEFER²;
MARCELO DE LIMA³

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

²EMBRAPA Suínos e Aves – daniellegava@gmail.com; rejane.schaefer@embrapa.br

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

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de suínos do mundo (ABPA, 2023). A vigilância de padrões sanitários na suinocultura é essencial para a proteção dessa importante atividade econômica no País. O *Senecavirus A* (SVA), embora não seja um agente causador de doença de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (SVO), provoca sinais clínicos semelhantes aos da Febre Aftosa, o que exige notificação e investigação criteriosa até o diagnóstico definitivo (BRASIL, 2013). Atualmente, o diagnóstico oficial de doenças vesiculares em suínos é realizado pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), com o intuito de descartar Febre Aftosa. No entanto, métodos indiretos, como a detecção de anticorpos, podem ser úteis para monitorar a circulação de SVA nas granjas ou avaliar a soroconversão após vacinação (BRASIL, 2020).

Tradicionalmente, a detecção de anticorpos é feita por meio de amostras de soro. Entretanto, suínos são particularmente sensíveis ao estresse, e a coleta de sangue, realizada pela punção do complexo veia cava/jugular, pode ser considerado um evento estressor e laborioso dentro do sistema de produção (MARTÍNEZ-MIRÓ *et al.*, 2016). Buscando alternativas menos invasivas, materiais como fluído de processamento, *swabs* de tonsilas e cavidade oro-nasal, e fluidos orais têm sido explorados no diagnóstico e vigilância de várias enfermidades em suínos (HENAO-DIAZ *et al.*, 2020). Dentre esses, a coleta de fluído oral (FO) é facilitada pelo comportamento exploratório natural dos suínos, permitindo que a coleta seja feita sem a necessidade de contenção, através do acesso oral e mastigação das cordas de algodão penduradas nas baias (HENAO-DIAZ *et al.*, 2020). Apesar das variações na concentração de microorganismos ao longo da infecção nas diferentes amostras usados para diagnóstico, já foi demonstrado que a cinética de anticorpos no FO de suínos é semelhante à do soro (HENAO-DIAZ *et al.*, 2020), e sua utilização já foi avaliada para diagnóstico de patógenos como os vírus da Peste Suína Africana (GIMÉNEZ-LIROLA *et al.*, 2016), Peste Suína Clássica (POPESCU *et al.*, 2019), Influenza A (PANYASING *et al.*, 2014), e Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (KITTAWORN RAT *et al.*, 2012).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de um Ensaio Imunoenzimático (ELISA) *in house* para detecção de IgG contra o *Senecavirus A* em amostras de fluído oral, visando oferecer um método de diagnóstico menos invasivo e eficaz para o monitoramento da circulação viral em granjas de suínos.

2. METODOLOGIA

As amostras de FO utilizadas para padronização do teste de ELISA indireto foram colhidas de suínos experimentalmente vacinados (controle positivo, n=8) e não vacinados (controle negativo, n=4) para SVA, a partir de uma vacina inativada

desenvolvida previamente e validada em camundongos (BARBOSA *et al.*, 2024). Para a coleta dos fluidos orais, cordas de algodão foram suspensas nas baias por 20 minutos, e cada amostra representou um *pool* por baia. Em seguida, as cordas foram recolhidas e colocadas em sacos plásticos individuais para extração do FO e processamento no laboratório. Para confirmação do *status* vacinal dos animais, amostras de sangue foram coletadas concomitantemente com as amostras de FO e submetidas à detecção de anticorpos contra SVA no soro, pelo de ensaio de soroneutralização (JOSHI *et al.*, 2016) (Comitê Ética e Experimentação Animal 15/2021).

Para avaliação da resposta humoral no FO pelo ELISA *in house*, placas de 96 poços (ref. 9017, Corning®) foram sensibilizadas com 37,8 µg/mL de vírus (SVA/BRA/GO/946-22/2019; Genbank OR567056; CMISEA ID 288 3258; SISGEN ID AFFB5D4) em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M e pH 9,6) em câmara úmida a 4 °C, *overnight*. Para padronização do teste, 100 µL/poço de amostras de FO foram testadas, em duplicatas, puras e em diluições de 1:2, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60 e 1:80. Em seguida, as placas foram incubadas com o conjugado *Anti-Pig IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody* produzido em coelho (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:40.000, conforme indicações do fabricante. As incubações foram realizadas em câmara úmida a 37 °C por 1 hora e foram realizadas 3 lavagens (PBS + 0,05% Tween 20) entre cada etapa. Por fim, 100 µL/poço da solução reveladora (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich®) foram adicionados. A reação de revelação foi parada com a adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (2 M) após 15 minutos. As placas foram lidas em espectrofotômetro, filtro 450 nm, para determinação da densidade ótica (DO).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos FO coletados de animais comprovadamente positivos e negativos para anticorpos contra o SVA no soro, com base no ensaio de soroneutralização, foram realizados testes utilizando diferentes diluições dos fluidos orais. Os resultados obtidos com o uso do FO puro mostraram-se ideais em comparação com as demais diluições, uma vez que a densidade ótica (OD) do controle positivo foi 12,88 vezes superior à do controle negativo. Com base nesses resultados, o FO puro foi selecionado como a diluição de trabalho.

Em relação às demais amostras de FO testadas no ELISA *in house* padronizado neste estudo, embora o número de amostras não tenha sido suficiente para a validação completa do teste, os resultados obtidos indicam uma clara distinção entre as amostras positivas e negativas com 100% de sensibilidade e especificidade, sendo a menor diferença de densidade ótica (OD) observada de 8,29 vezes entre o controle positivo com menor OD e o controle negativo com maior OD (Figura 1).

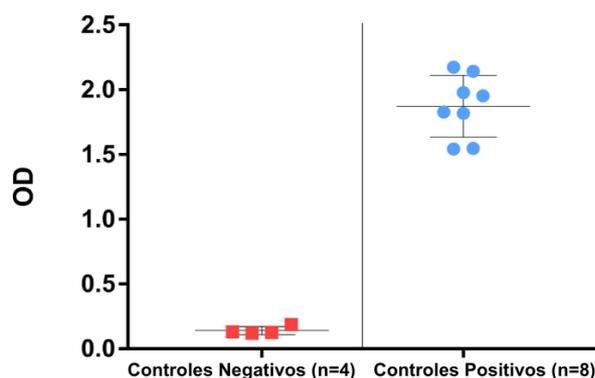


Figura 1: Gráfico de dispersão com valores de OD do ELISA *in house* para detecção de IgG contra SVA em FO. Os valores estão apresentados individualmente para cada *pool*, sendo o quadrado vermelho utilizado para representar *pool* de animais não vacinados para SVA (controles negativos), e círculo azul para *pool* de animais vacinados para SVA (controles positivos), confirmado por ensaio de soroneutralização. A média e \pm desvio padrão são representados pelas linhas pretas atrás dos valores plotados.

Considerando os altos níveis de anticorpos séricos já detectados, a vasta distinção entre os dois grupos testados era esperada. Entretanto, para a validação robusta do teste, é necessário utilizar amostras de campo provenientes de animais com diferentes níveis de anticorpos séricos, bem como avaliação de reações cruzadas com outros agentes. Isso permitirá uma avaliação mais abrangente da aplicabilidade do ELISA *in house* em cenários de infecção natural ou resposta vacinal. Testes de ELISA para detecção de anticorpos contra SVA já foram padronizados por Dvorak *et al.* (2017) e Yan *et al.* (2023) utilizando amostras de soro, entretanto, amostras de FO não foram incluídas nas padronizações. A utilização de amostras de FO já foi descrita para detecção viral, onde o vírus pode ser detectado antes do surgimento dos sinais clínicos (HOLE; AMBAGALA; NFON, 2019). Entretanto, essa abordagem é restrita ao diagnóstico na fase aguda da infecção uma vez que a excreção do vírus no FO se mantém por no máximo 28 dias após a infecção (MAGGLIOLI *et al.*, 2018).

A presença de anticorpos contra SVA no soro de suínos infectados já foi detectada por até 60 dias após a infecção (MAGGIOLI *et al.*, 2018). A duração da circulação de IgG no soro e, conseqüentemente, no FO ressalta o valor da sorologia para o monitoramento prolongado da infecção em rebanhos. Esses achados sugerem que, apesar da menor concentração de anticorpos no FO, sua utilização pode proporcionar uma alternativa eficiente e menos invasiva para a vigilância epidemiológica de grandes populações suínas, destacando-se como uma abordagem prática e viável em cenários de produção intensiva.

4. CONCLUSÕES

A análise das amostras de FO permitiu a detecção de imunoglobulinas IgG contra o SVA utilizando um teste de ELISA *in house*, evidenciando-se como uma fonte promissora para monitoramento de rebanhos. Estudos adicionais, com amostras de campo, são necessários para confirmar o potencial desse teste em diferentes cenários de manejo e infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Produção Brasileira de Carne Suína. In: **Relatório Anual 2023**. São Paulo, 2023. Disponível em: <<https://abpabr.org/abpa-relatorio-anual/>>. Acesso em: 17 de setembro de 2024.
- BARBOSA, Amanda de Oliveira *et al.* Immunogenicity of an Inactivated Senecavirus A Vaccine with a Contemporary Brazilian Strain in Mice. **Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 845, 2024.
- BJUSTROM-KRAFT, J. *et al.* The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. **Journal of Swine Health and Production**, v. 26, n. 5, p. 262-269, 2018.
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA No 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Notificação de doenças relativas à suinocultura**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/saude-suidea/notificacao-de-doencas-relativas-a-suinocultura>. Acesso em: 24 set. 2024.
- DVORAK, C.M.T., *et al.* An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine. **BMC Vet Res**. v. 13, p. 1-6, 2016.
- GIMÉNEZ-LIROLA LG, *et al.* Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161230, 2016.
- HENAO-DIAZ A, *et al.* Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. **Porcine Health Manag.** v. 6, p. 1-12, 2020.
- HOLE, K.; AMBAGALA, T.; NFON, C. Vesicular disease in pigs inoculated with a recent Canadian isolate of Senecavirus A. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 4, p. 242-247, 2019.
- JOSHI, L. R. *et al.* Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 3267-3279, 2016.
- KITTAWORNRAT, A. *et al.* Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 262-269, 2012.
- MAGGIOLI, M. F., *et al.* Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs. **Journal of Virology**, v. 92, n. 3, 2018.
- MARTÍNEZ-MIRÓ, S., *et al.* Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. **BMC Vet Res** v. 12, p. 1-9, 2016.
- PANYASING, Y. *et al.* Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, n. 2, p. 177-184, 2014.
- POPESCU, L. N. *et al.* E2 and Erns isotype-specific antibody responses in serum and oral fluid after infection with classical swine fever virus (CSFV). **Veterinary microbiology**, v. 235, p. 265-269, 2019.
- YAN, J., *et al.* The Establishment and Application of Indirect 3AB-ELISA for the Detection of Antibodies against Senecavirus A. **Viruses** v. 15, n. 4, p. 861, 2023.