

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO *SENECAVIRUS A* EM SUÍNOS NO BRASIL

ALICE VALENTE GONÇALVES PORTILHA¹; AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA², GABRIEL DA SILVA ZANI², LEONARDO CLASEN RIBEIRO², FLÁVIA BARTZ NUNES²; MARCELO DE LIMA³

¹*Universidade Federal de Pelotas – alicevgportilha@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com; gzani27@gmail.com;*
leonardo.clasen@gmail.com; flaviabartznunes8@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O *Senecavirus A* (SVA) está classificado na família *Picornaviridae*, gênero *Senecavirus* (ICTV, 2020). Em relação à morfologia, o SVA é um vírus não envelopado, que contém um genoma RNA fita simples de sentido positivo com aproximadamente 7.300 nucleotídeos e apresenta capsídeo icosaédrico (HALES et al., 2008).

O vírus foi inicialmente relacionado com doença clínica em suínos no Canadá e nos EUA em 2008 e 2012, respectivamente, através de amostras clínicas de suínos com doença vesicular (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008; SINGH et al., 2012). Posteriormente, surtos envolvendo o agente foram relatados em vários países, incluindo Brasil, onde o vírus continua circulando em diversos estados e causando importantes prejuízos econômicos para suinicultura. (VIEIRA et al., 2022).

Ainda, a infecção pelo SVA pode ser confundida com outras doenças vesiculares de suínos, principalmente febre aftosa, o que aumenta a necessidade de controle do patógeno. Dentre as manifestações clínicas associadas com a infecção por SVA estão letargia, claudicação, anorexia, diarreia e, principalmente, lesões vesiculares no focinho, cavidade oral e banda coronária (JOSHI et al. 2016). A transmissão do vírus se dá através do contato direto ou indireto com as lesões ou secreções, que podem conter de 2×10^7 até $1,2 \times 10^{11}$ cópias genômicas (GUO et al., 2016; LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2017).

Durante a replicação, assim como a maioria dos vírus de genoma RNA, o SVA pode sofrer mutações no genoma. A ocorrência dessas alterações foi demonstrada por diversos estudos. Dentre eles, um estudo realizado na China encontrou 28 substituições quando comparou uma cepa viral isolada no país em 2017 com outra isolada em 2015. Ainda, quando compararam a contemporânea com o primeiro isolado de SVA, o protótipo SVV-001, foram detectadas 55 mudanças de aminoácidos (CHEN et al., 2018).

No Brasil, principalmente após 2016, não há dados acerca da avaliação da evolução genética e molecular do vírus no país. Considerando esses fatos, o sequenciamento do genoma de amostras de SVA brasileiras possibilitará estudar a origem e distribuição e evolução genética do agente no país. Além disto, a caracterização genética permite uma seleção adequada de isolados que possam ser testados como candidatos vacinais, já que a escolha da cepa é um passo importante no desenvolvimento de vacinas e pode resultar em uma maior eficácia frente aos isolados virais circulantes no país.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo obter dados sobre o genoma completo de isolados brasileiros do SVA que permitirá um conhecimento detalhado sobre a diversidade genética e a evolução do *Senecavirus A* no Brasil a partir de 2018.

2. METODOLOGIA

Foram disponibilizadas pelo Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO – LDFA/MG um total de 614 isolados virais provenientes de amostras clínicas de suínos com diagnóstico positivo para *Senecavirus A*. As amostras foram coletadas entre os anos 2018 e 2021, 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). Após o recebimento no Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPEL, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o seu processamento.

Células da linhagem H1299 (*human non-small cell lung carcinoma cell*) foram cultivadas em placas de 24 orifícios, em meio RPMI-1640 com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para adsorção, as amostras virais foram inoculadas individualmente na monocamada de células H1299 em confluência de aproximadamente 80% e incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Concomitantemente, cultivos celulares sem a adição das amostras virais foram utilizados como controle negativo. A cada 24h, os cultivos foram avaliados quanto a formação do efeito citopático (ECP) resultante da multiplicação viral e característico do SVA. Após uma passagem em células H1299, as culturas apresentando ECP foram consideradas positivas e o sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação e armazenado a -80C até seu processamento.

Visando comparar filogeneticamente cepas de SVA circulantes nos estados brasileiros e utilizando como critério de seleção a distribuição geográfica e temporal dos isolados, foram selecionadas 501 amostras para sequenciamento do genoma completo. Após o cultivo, para a obtenção do RNA total das amostras selecionadas, 200µL da suspensão resultante do isolamento/amplificação viral foram utilizados para extração, utilizando o *kit* comercial *BioGene Extração de DNA/RNA Viral (Quibasa-Bioclin)*, conforme instruções do fabricante. Após a extração, o RNA previamente quantificado, foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o *kit* comercial *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BIO RAD), para a obtenção do DNA complementar (cDNA).

O sequenciamento do genoma completo de 50 isolados foi realizado seguindo a metodologia utilizada por Joshi et al. (2016). Resumidamente, 9 pares de *primers* (F1-F9) que abrangem toda a extensão do genoma do SVA foram utilizados em reações de RT-PCR. Os produtos das RT-PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a amplificação e foram posteriormente purificados, utilizando o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up* (Promega). Os produtos purificados foram sequenciados pelo método Sanger, no equipamento ABI3130xl *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) em parceria com a EMBRAPA CNPSA, Concórdia, SC. A obtenção das sequências consenso e montagem das sequências completas foram realizados utilizando o programa *Geneious Prime* (versão 2022.0.2) com base na sobreposição das extremidades das sequências analisadas. O sequenciamento dos outros 451 isolados foi realizado pela metodologia Nanopore na *Cornell University*, EUA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação dos isolados virais foi realizada pela inoculação de uma alíquota viral em monocamadas de células H1299. De um total de 614 amostras, 97,4% apresentaram ECP característico da replicação viral em até 72h pós-inoculação. Em relação a seleção das amostras para sequenciamento, embora não tenha sido feita com base estatística, a escolha dos 501 isolados contemplou amostras dos oito estados onde houve coleta pelo LANAGRO nos anos de 2018 a 2021. Todas as amostras selecionadas para sequenciamento tiveram identidade confirmada pela reação de RT-PCR.

Pelo sequenciamento genômico e posterior montagem dos fragmentos (tanto pela metodologia de *Sanger* ou *Nanopore*), foi possível obter 501 genomas completos do SVA o que permitirá, em análises subsequentes entender melhor a diversidade genética e a evolução do SVA no país. Além disso, considerando a taxa de mutação demonstrada por diversos trabalhos em outros países, essa caracterização de amostras circulantes no Brasil pode auxiliar na elaboração de estratégias para controle do vírus nos rebanhos suínos.

Ainda, o sequenciamento viral permite o estudo das possíveis origens do vírus a partir da comparação entre as similaridades das sequências genômicas. Um estudo conduzido na China identificou similaridade genômica entre vírus isolados no Brasil, Canadá e Estados Unidos, sugerindo que o vírus pode ter entrado na China por diversas rotas (ZHANG *et al.*, 2021). Já em um estudo realizado no Vietnã, a caracterização da cepa isolada do primeiro caso identificado apresentou similaridade elevada (98,5-99%) com sequências de vírus circulantes na China, o que indica uma possível transmissão entre os dois países (ARZT *et al.*, 2019).

Esses resultados reforçam a necessidade de controle e rastreamento do agente, bem como a importância de entender melhor a evolução do SVA no Brasil para elaboração de estratégias de controle da circulação do patógeno no país.

4. CONCLUSÕES

O isolamento viral, a seleção de amostras para sequenciamento e a 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

ARZT, J. *et al.* First Detection and Genome Sequence of Senecavirus A in Vietnam. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 3, p. 17–18, 2019.

CHEN, P. *et al.* The Distribution of Different Clades of Seneca Valley Viruses in Guangdong Province, China. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 5, p. 394–401, 2018.

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

HALES, L. M. et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus001, a novel oncolytic picornavirus. **Journal of general virology**, v. 89, n. 5, p. 1265-1275, 2008.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**. 2020. Disponível em:<<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>>. Acesso em 19 de setembro de 2023.

JOSHI, L. R. et al. Detection of the emerging picornavirus Senecavirus A in pigs, mice, and houseflies. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1536-1545, 2016.

LEME, R. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Update on Senecavirus infection in pigs. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 170, 2017.

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

SINGH, K. et al. Seneca valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 3, n. 6, p. 6, 2012.

VIEIRA, M.V., et al. The third wave of Seneca Valley virus outbreaks in pig herds in southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 53, p. 1701–1706, 2022.

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, X. et al. Review of Seneca Valley virus: a call for increased surveillance and research. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 940, 2018.