

OTIMIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DO SENECAVIRUS A EM SUÍNOS

Vanessa Haach¹, Danielle Gava² e Rejane Schaefer²

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Campus de Joaçaba, Joaçaba, SC, bolsista PIBIC/CNPq na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, vanessahaach@hotmail.com.

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Palavras-chave: Senecavirus A, RT-PCR, diagnóstico, suínos.

INTRODUÇÃO

O Senecavirus A (SVA) é um vírus RNA de fita simples, não envelopado, pertencente ao gênero *Senecavirus*, membro da família *Picornaviridae*. O genoma viral é composto por aproximadamente 7300 pares de base, dividido em região L, P1, P2 e P3 (1, 2). A P1 codifica a proteína do capsídeo que é clivada durante a replicação viral em VP0, VP3 e VP1; já a P2 e P3 são proteínas não estruturais e são clivadas em 2A, 2B, 2C e 3A, 3B, 3C, 3D, respectivamente (6, 9). O SVA foi detectado inicialmente como contaminante celular em 2002 (3) e desde então seu envolvimento em doença vesicular em suínos foi relatado no Canadá em 2008 e nos Estados Unidos em 2012 (3, 10). Em 2015 o SVA foi associado a doença vesicular e mortalidade neonatal em suínos nos Estados Unidos, China e Brasil (4, 7, 8, 12, 14). Clinicamente, os suínos apresentam lesões vesiculares no focinho, na mucosa oral e na parede do casco, podendo manifestar também anorexia, letargia e febre (4, 8, 9). Como estes sinais clínicos são indistinguíveis de outros vírus que causam doença vesicular em suínos, como a febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular e exantema vesicular, e as lesões microscópicas encontradas nos suínos acometidos pela doença não são patognômicas da infecção por SVA, é essencial a rápida identificação do agente viral envolvido no surto de doença vesicular. Diferentes métodos de diagnóstico têm sido descritos, como o isolamento viral e imunofluorescência (4, 13). No entanto, torna-se indispensável utilizar um ensaio de diagnóstico que seja rápido, sensível e específico para detecção de SVA em suínos. Este trabalho teve como objetivo otimizar um ensaio de RT-PCR para detecção do SVA em suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de líquido vesicular e pele da vesícula foram coletadas de um suíno que apresentava lesão vesicular sugestiva de infecção por SVA (protocolo 235/15). As amostras biológicas foram maceradas em meio essencial mínimo e centrifugadas a 3000rpm a 4°C para remoção dos debris celulares. A extração de RNA foi realizada com o Kit MagMAX™ Viral RNA Isolation (Ambion) e o RNA foi transcrito com a enzima transcriptase reversa fornecida no Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Na reação de RT-PCR utilizou-se um par de *primers* específicos para a região VP1 do SVA: C556F- (F5'- TCG GTT TAC TCC GCT GAT GGT TGG -3') e D441R- (R5'- GGT CGT AGA CAA AGC TGG AAG CCT GG -3'), descritos por Knowles e colaboradores (2005) (5), que amplifica um produto de 628 pares de base. Na padronização da RT-PCR foi utilizado o Kit Taq DNA Polimerase, 10X PCR Buffer, MgCl₂ 50mM (Invitrogen), variando as quantidades de magnésio 50mM (1,0, 2,0 e 3,0mM), dNTPs 10mM (0,5 e 1,0μL), *primers* a 10pmol (0,6 e 1,2μL) e temperatura de anelamento dos *primers* (57, 59, 61 e 63°C). Como controle negativo da reação foi utilizada água ultrapura. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizados sob luz ultravioleta. Para confirmar a identidade do amplicon, o fragmento de DNA foi recortado do gel, purificado com o Kit BigDye XTerminator (Qiagen) e, em seguida, foi realizado o sequenciamento de DNA pelo método de Sanger utilizando o ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A sequência gerada foi comparada com sequências do SVA disponíveis em banco de dados genéticos (GenBank), e analisadas utilizando o software MEGA 6 (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de RT-PCR para detecção de SVA foi otimizada com os seguintes parâmetros: 2,0mM de MgCl₂, 1,0μL de dNTPs (10mM), 0,6μL dos *primers forward* e *reverse* (a 10pmol), além de 2,5μL do buffer da PCR, 0,3μL de Taq DNA Polimerase e 16,0μL de água ultrapura, totalizando um volume final de 25μL. A ciclagem foi estabelecida da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi de 628 pares de base. A sequência gerada pelo sequenciamento apresentou 99% de similaridade de nucleotídeos (nt) com outras amostras brasileiras, 96-98% de similaridade com amostras de SVA americanas e 93% de similaridade com a sequência protótipo SVV001; o que comprova a especificidade da amplificação pela RT-PCR aqui otimizada. A técnica de RT-PCR como método de diagnóstico para a detecção do SVA em suínos permitiu a distinção entre o SVA e outras infecções vesiculares clássicas, como a febre aftosa, estomatite vesicular, doença vesicular suína e exantema vesicular suíno. Diferentes métodos têm sido descritos e outros estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico do SVA em suínos (1, 4, 13), porém este ensaio de RT-PCR mostrou-se rápido, sensível e específico, possibilitando a identificação do SVA em suínos, evitando maiores impactos produtivos no setor suinícola.

CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR para detecção de SVA em suínos foi otimizada e apresenta-se como uma ferramenta de diagnóstico extremamente útil e importante na detecção de ácido nucleico do SVA em amostras clínicas de suínos. Além disso, a detecção viral pode fornecer informações sobre a prevalência do SVA nos plantéis brasileiros, auxiliando nas medidas de controle da infecção.

REFERÊNCIAS

1. BRACHT, A.J. et al. Real-Time Reverse Transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens. **Plos One**, v.11, n.1, p.1-13, 2016.
2. CHEN, Z. et al. Construction and characterization of a full-length cDNA infectious clone of emerging porcine Senecavirus A. **Virology**, v.497, p.111-124, 2016.
3. HALES, L.M. et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley Virus-001, a novel oncolytic picornavirus. **Journal of General Virology**, v.89, n.5, p.1265-1275, 2008.
4. 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.
5. KNOWLES, N.J. et al. Epidemiology of Seneca Valley Virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. **EUROPIC**, 2005.
6. KNOWLES, N.J. et al. Taxonomy of Picornaviridae: current situation and future proposals. **EUROPIC**, 2006.
7. LEME, R.A. et al. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.62, n.6, p.603-611, 2015.
8. LEME, R.A. et al. Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil. **Emerging and Infectious Diseases**, v.22, n.7, p.1238-1241, 2016.
9. SEGALLES, J. et al. Senecavirus A: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs? **Veterinary Pathology**, 2016.
10. SINGH, K. et al. Seneca Valley Virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **Veterinary Science and Technology**, v.3, n.6, p.1-3, 2012.
11. TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.
12. ZHANG, J. et al. Full-length genome sequences of Senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U.S. swine. **Genome Announcements**, v.3, n.6, p.1-2, 2015.
13. YANG, M. et al. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley Virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.1, p.42-50, 2012.
14. WU, Q. et al. Complete genome sequence of Seneca Valley Virus CH-01-2015 identified in China. **Genome Announcements**, v.4, n.1, 2016.