

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL

JULIANA DA SILVA GOMES RIEGER

**Senecavirus A - Uma abordagem biotecnológica
para a vigilância em doenças vesiculares**

CAMPO GRANDE-MS

2022

JULIANA DA SILVA GOMES RIEGER

**Senecavirus A - Uma abordagem biotecnológica
para a vigilância em doenças vesiculares**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró Centro-Oeste, para realização do Exame de Defesa componente obrigatório para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientador: Dr. Edgar Julian Paredes Gamero

Coorientadora: Dra. Lenita Ramires dos Santos

CAMPO GRANDE –MS

2022

RESUMO

RIEGER, Juliana. S.G., Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Dezembro, 2022. **Senecavirus A – Uma abordagem biotecnológica para a vigilância em doenças vesiculares.** Orientador: Dr. Edgar Julian Paredes Gamero. Co-Orientadora: Dra. Lenita Ramires dos Santos. Senecavirus A (SVA) é um vírus não envelopado, RNA de fita simples de senso positivo do gênero *Senecavirus*, família *Picornaviridae*. Este vírus causa doença vesicular em suínos, clinicamente indistinguível de outras doenças, tal como febre aftosa, doença vesicular de suínos, estomatite vesicular e exantema vesicular de suínos. Os principais sinais clínicos são lesões vesiculares em suínos e morte em leitões. No Brasil, surtos foram reportados inicialmente no final de 2014, e desde então, tem causado prejuízos na suinocultura, principalmente devido a doença possuir similaridade com febre aftosa, uma doença devastadora na suinocultura e de grande importância econômica. Diante desse cenário, se faz necessário o aprimoramento de testes diagnósticos. Neste estudo, a proteína recombinante viral 2 (VP2) foi produzida para o desenvolvimento de um ensaio ELISA indireto para identificar a presença e níveis de anticorpos contra SVA em propriedades brasileiras de produção de suínos. Valores de sensibilidade e especificidade do ELISA baseado em VP2 foram determinados utilizando a análise da curva ROC com 43 amostras de soro positivas e 219 amostras negativas. Adicionalmente, amostras de soro de suínos imunizados com oito distintas cepas brasileiras de SVA inativadas (MF615501, MF615502, MF615503, MF615505, MF615506, MF615507, MF615509 e MZ456812) foram testadas com o ELISA. A reação cruzada com estomatite vesicular foi testada utilizando soro de 17 suínos naturalmente infectados e positivos para esta doença. Como resultado, o ELISA baseado em VP2 apresentou 100% de especificidade e 74,4% de sensibilidade. Na fase aguda da doença, a sensibilidade do teste foi de 100% e 9 meses após o início dos sinais clínicos a sensibilidade do teste diminuiu para 73.35%. O ELISA desenvolvido neste estudo foi capaz de detectar anticorpos específicos em soro de suínos que receberam três das oito cepas brasileiras inativadas. Adicionalmente, possibilitou a detecção de anticorpos de SVA de animais na fase aguda e crônica e não

apresentou reação cruzada com estomatite vesicular. Este ensaio é uma ferramenta útil no monitoramento e diagnóstico da doença.

ABSTRACT

RIEGER, Juliana. S.G., Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Dezembro, 2022. **Senecavirus A – Uma abordagem biotecnológica para a vigilância em doenças vesiculares.** Orientador: Dr. Edgar Julian Paredes Gamero. Co-Orientadora: Dra Lenita Ramires dos Santos. Senecavirus A (SVA) is a nonenveloped, single-stranded RNA virus of the genus Senecavirus, family Picornaviridae. This virus causes a vesicular disease in swine, clinically indistinguishable from other vesicular diseases, such as foot-and-mouth disease (FMVD), swine vesicular disease (SVD), vesicular stomatitis (VS) and vesicular exanthema of swine (VES). The clinical signs are vesicular lesions in sows and acute death in piglets. In Brazil, outbreaks were reported initially in the end of 2014, and since then, it has been disadvantageous on swine production, most the economic importance of the disease is related to similarity with FMVD. In this study, recombinant Viral Protein 2 (VP2) protein was produced to develop an indirect ELISA assay to identify the presence and levels of antibodies against SVA in Brazilian swine herds. Sensitivity and specificity values of the VP2 ELISA were determined using ROC analysis performed with 43 positives samples and 219 negatives samples. In addition, serum samples from swine immunized with eight distinct Brazilian SVA inactivated strains (MF615501, MF615502, MF615503, MF615505, MF615506, MF615507, MF615509 and MZ456812) were tested in the VP2 ELISA. Cross-reactivity with VS was tested with sera from 17 pigs naturally-infected with sera from positive animals for this disease. The results about SVA VP2 indirect ELISA, assuming a 100% specificity, the test showed 74.4% sensitivity. In the onset of clinical signs, sensitivity was 100% and 9 months after the onset, sensitivity was 73.35%. The VP2 ELISA was able to detect specific antibodies in sera from swine that received three of the eight Brazilian SVA inactivated strains. The VP2 ELISA developed here was able to detect specific antibodies of SVA in acute and recovered pigs and no cross-reaction with SV. This assay is a useful tool in monitoring the disease and could help to improve the disease diagnosis.

Sumário

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Suinocultura	3
2. Doenças Vesiculares em Suínos	5
3. Senecavirus A	7
3.1. Características do vírus	7
3.2. Histórico	9
3.3. Patogenia e Sinais Clínicos	11
4. Diagnóstico	13
III. JUSTIFICATIVA	15
IV. OBJETIVOS	16
V. ARTIGO CIENTÍFICO	17
INTRODUCTION	18
MATERIAL AND METHODS.....	19
VP2 3D modeling and epitope identification	19
Expression and production of the rVP2	19
Swine serum samples	20
Experimental SVA immunization	20
RT-qPCR and serum virus neutralization assays for SVA	20
VP2 antibody detection by rVP2 SVA ELISA.....	21
VP2 antibody detection by Western blotting	21
Statistical analysis.....	21
RESULTS	22
rVP2 protein expression.....	23
rVP2 ELISA optimization and validation	23
Experimental immunization analysis	25
Comparison of rVP2 SVA ELISA and SVN/RT-PCR	25
DISCUSSION	26
ACKNOWLEDGMENTS.....	27
CONFLICTS OF INTEREST	27
REFERENCES	27

VI. CONCLUSÕES GERAIS	29
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

I. INTRODUÇÃO

Senecavirus A (SVA), antigamente conhecido como *Seneca Valley Virus 1* – SVV-001, é composto por um capsídeo icosaédrico formado por RNA de fita simples de sentido positivo pertencente a ordem *Picornaviridales*, família *Picornaviridae*, gênero *Senecavirus* (Hales, Knowles et al. 2008, Adams, Lefkowitz et al. 2015). Isolado acidentalmente em 2002, em um cultivo de células PER.C6 (células do retinoblasto fetal humano), presume-se que o vírus tenha sido introduzido por meios de cultivo contaminados, como tripsina e soro fetal bovino (Hales, Knowles et al. 2008).

Desde 2015, o número de infecções por SVA vem aumentando em países como China (Qian, Fan et al. 2016, Wu, Zhao et al. 2017), Estados Unidos (Canning, Canon et al. 2016), e em diferentes regiões do Brasil (Leme, Zotti et al. 2015). A transmissão ocorre pelo contato direto com lesões vesiculares, via oral, alimentos contaminados, urina e fezes (Leme, Alfieri et al. 2017, Xu, Hole et al. 2017). Como consequência, vários surtos de SVA tem surgido com as mesmas características, como lesões vesiculares e erosivas no focinho e patas, morte entre 30-70% de leitões na primeira semana de vida, associado com claudicação, letargia, sinais neurológicos e/ou diarreia (Zhang, Zhu et al. 2018, Houston, Temeeyasen et al. 2020, Vannucci, Linhares et al. 2015).

Contudo, os mesmos sinais clínicos são causados por vírus relacionados a outras importantes enfermidades, incluindo doença vesicular suína (SVD), estomatite vesicular (EV), e exantema vesicular de suínos (EVS) (Maggioli, Lawson et al. 2018, Liu, Wang et al. 2020, Yang, Gagliardi et al. 2020).

Além das doenças citadas, a mais importante é a Febre Aftosa, uma doença devastadora e de notificação compulsória pela Organização Mundial de Saúde (OIE), é responsável por perdas econômicas consideráveis, devido a exigência de investigação oficial, abate de animais afetados, restrição na exportação e movimento de animais (Segales, Barcellos et al. 2017).

No Brasil, uma vacina contra SVA licenciada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) foi desenvolvida baseada na técnica de patógeno inativado. Porém, o diagnóstico diferencial para SVA apresenta grande importância pelo fato de envolver doenças vesiculares que possuem alto impacto econômico na suinocultura.

O genoma do SVA é composto por aproximadamente 7280 nucleotídeos, com um código de leitura aberto codificando uma única poliproteína, que é clivada em 12 polipeptídeos: a proteína líder, 4 polipeptídeos de P1 (estrutural), 3 polipeptídeos de P2 e 4 polipeptídeos de P3 (não estrutural) (Hales, Knowles et al. 2008). Sítios antigênicos localizados nas proteínas VP's na região externa do capsídeo viral (VP1, VP2 e VP3), resultantes da clivagem da região P1, estão envolvidos na neutralização dos picornavírus (Maggioli, Lawson et al. 2018). Desta forma, um Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISAI) baseado em VP2 mostrou alta e conservada antigenicidade possibilitando um teste rápido para descartar a presença de outras importantes doenças vesiculares, principalmente a Febre Aftosa (Dvorak, Akkutay-Yoldar et al. 2016).

Como o diagnóstico diferencial baseado em sinais clínicos de doenças vesiculares é difícil, destaca-se a importância do desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido e eficaz (Yang, Zhu et al. 2018). O objetivo deste estudo foi avaliar a detecção sorológica de SVA, bem como, identificar a presença e níveis de anticorpos nas fases aguda e crônica de animais infectados com essa doença em um surto no Brasil por meio de ELISA baseado na proteína recombinante VP2. Adicionalmente, avaliar a detecção de anticorpos específicos em soro de suínos que receberam oito distintas cepas de SVA brasileiras inativadas.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Suinocultura

A produção global de carne suína está em torno de 124 milhões de toneladas em 2022, com aumento de 1,8% em relação a 2021, com a China representando cerca de 46% da produção global (FAO, 2022). Seguindo em ordem decrescente outros 9 países: União Europeia, Estados Unidos, Brasil, Rússia, Vietnã, Canadá, México, Coreia do Sul e Japão (EMBRAPA, 2021) (Figura 1).

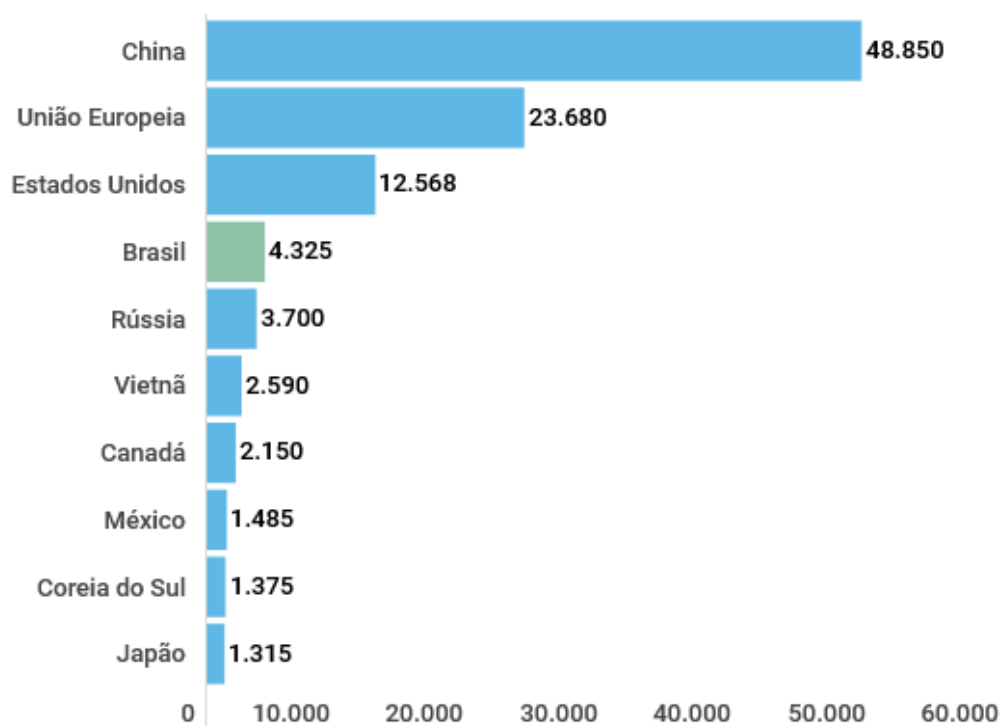


Figura 1 – Maiores produtores de carne suína no mundo (mil toneladas) por ano.
Fonte: EMBRAPA (2021).

No Brasil, dados da Associação Brasileira de Proteína Animal mostram que o valor bruto da produção da carne suína subiu de 21 bilhões para 31 bilhões de reais nos últimos 10 anos, o que representa um aumento de quase 70%, concentrado principalmente na região sul do país, porém os estados de Minas Gerais, Mato

Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo são importantes produtores (ABPA, 2021) (Figura 2).

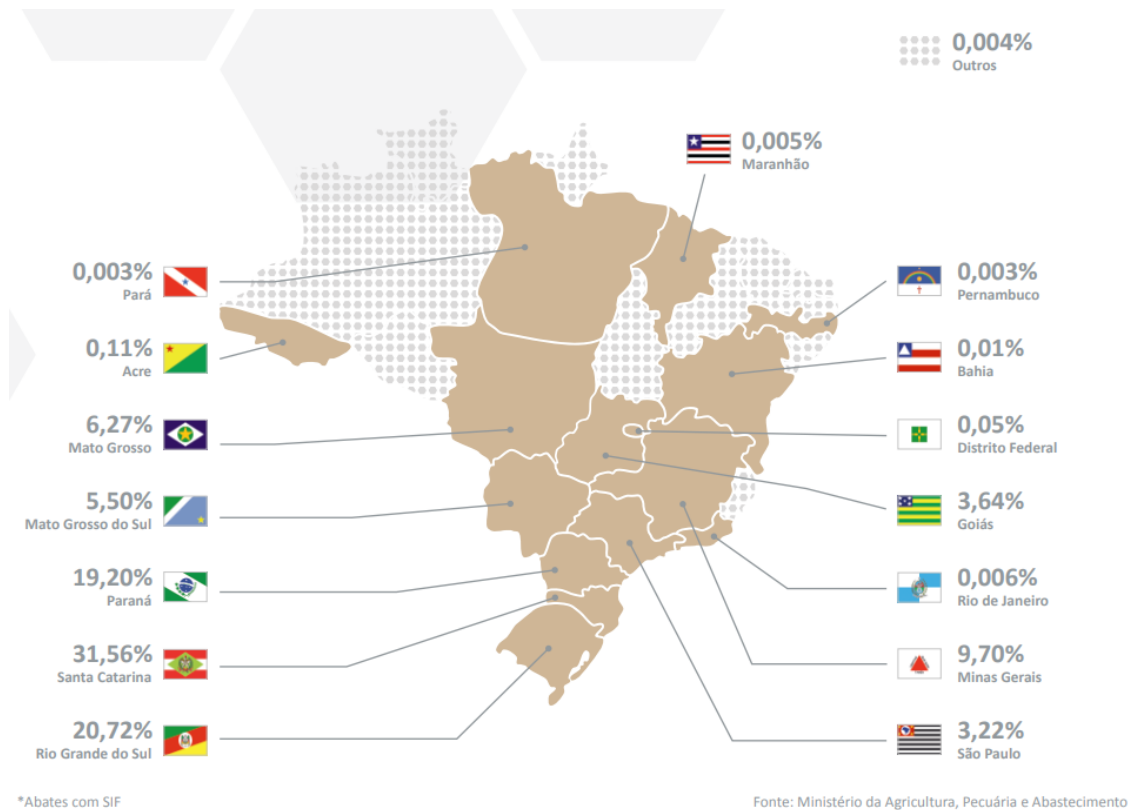


Figura 2 – Maiores produtores de carne suína no Brasil representado em porcentagem de abate por ano. Fonte: ABPA (2021).

No que se refere ao destino, 76% da produção vai para o mercado interno e 24% para exportações, com 1,137 milhões de toneladas de carne exportada no ano de 2021, apresentando um aumento de 11,03% em relação a 2020, liderando o 4º lugar no ranking mundial de maiores exportadores de carne suína no mundo (EMBRAPA, 2021).

2. Doenças Vesiculares em Suínos

As doenças vesiculares em suínos no Brasil têm apresentado aumento acentuado nas notificações ao serviço veterinário oficial entre junho e novembro de 2015 e novamente no último trimestre de 2018, certamente devido ao início dos surtos de SVA (BRASIL, 2019) (Figura 3).

No entanto, os sinais clínicos observados são indistinguíveis entre as principais doenças vesiculares em suínos: Vírus da Febre Aftosa (*Foot-and-mouth disease virus* – FMDV), Vírus da Doença Vesicular dos suínos (*Swine vesicular disease virus* – SVDV) Vírus do Exantema Vesicular dos Suínos (*Vesicular exanthema of swine virus* – VESV) e Vírus da Estomatite Vesicular (*Vesicular stomatitis indiana virus* – VSIV) (YOON; ZIMMERMAN; MORILLA, 2008).

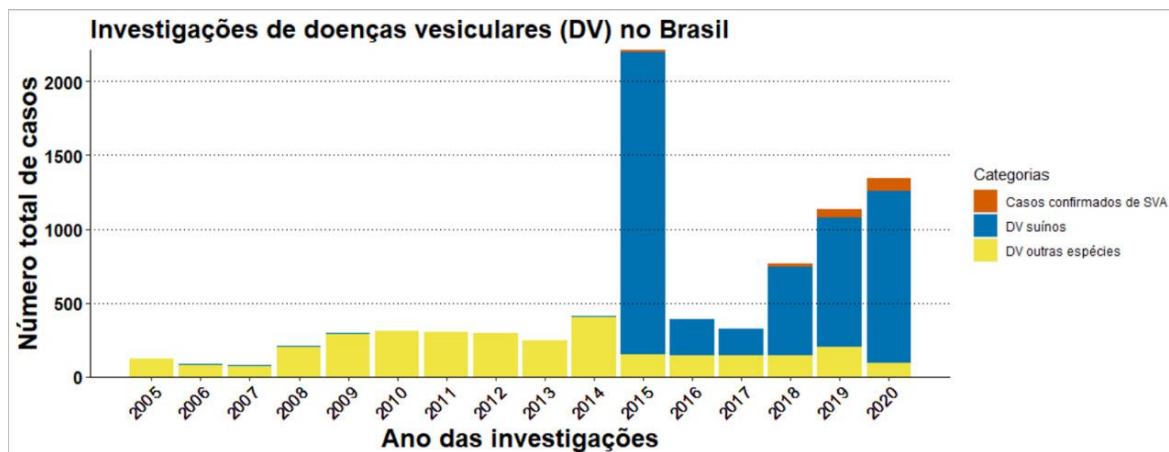


Figura 3. Notificações de doença vesicular em suínos no Brasil, entre 2015 e 2020. Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Comunicação).

Devido a Febre Aftosa ser a doença de maior preocupação, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou o plano estratégico 2017-2026 do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA para enfrentar os desafios da última etapa da erradicação da doença, e assim, consolidar a condição sanitária conquistada no Brasil. Dessa maneira, faz-se obrigatória a notificação e investigação em qualquer caso suspeito (BRASIL, 2020).

Desta forma, foi criado um fluxo de investigação em caso suspeito de doença vesicular pelo serviço veterinário oficial, primeiramente é realizada a investigação clínica, no caso de suspeita de lesões com possível origem infecciosa deve-se enviar amostras para um laboratório oficial onde será realizado o teste de Febre Aftosa, quando negativo, é realizado o teste para EV, e em seguida, o teste para SVA (BRASIL, 2017) (Figura 4).

Recentemente, focos de estomatite vesicular foram confirmados em várias regiões do Brasil (CARGNELUTTI; OLINDA; MAIA; DE AGUIAR *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA; JÚNIOR; CAMARGOS; ORZIL *et al.*, 2018). Enquanto a Doença Vesicular dos Suínos nunca foi reportada no Brasil, porém deve ser inserida no fluxo de investigação em casos de SVA negativo (BRASIL, 2019). Além disso, o Vírus do Exantema Vesicular dos suínos é o agente de uma doença considerada erradicada há muitos anos (BRASIL, 2009).

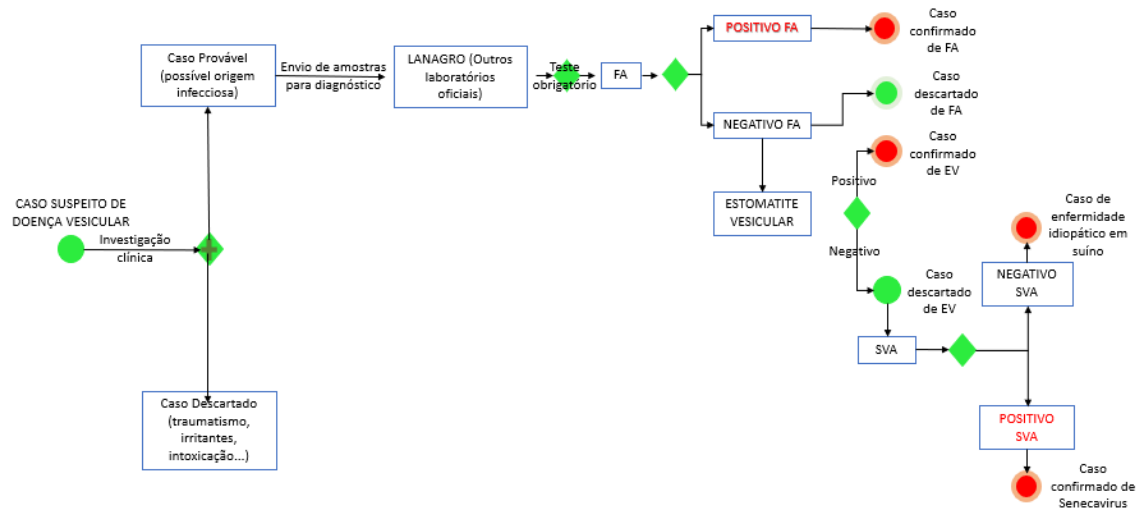


Figura 4. Fluxo de investigação em caso suspeito de doença vesicular. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2019.

No Brasil, devido a vários surtos de SVA houve o aumento das notificações de doenças vesiculares e nota-se que a doença vem se espalhando rapidamente, causando perdas econômicas na suinocultura (LEME; ZOTTI; ALCANTARA;

OLIVEIRA *et al.*, 2015). Destaca-se ainda o fato de SVA ser uma doença que está no início no Brasil e no mundo, despertando a preocupação e necessidade de estudos básicos e aplicados sobre o SVA.

3. Senecavirus A

3.1. Características do vírus

Senecavirus A (SVA) é um vírus de RNA pequeno, não envelopado, de fita simples e sentido positivo pertencente ao gênero *Senecavirus* e família *Picornaviridae* (VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008).

O genoma do vírus apresenta aproximadamente 7280 nucleotídeos de comprimento, com uma região não traduzida na extremidade 5' de 666 nucleotídeos, um único quadro de leitura aberto contendo 6543 nucleotídeos e outra região não traduzida na extremidade 3' de 71 nucleotídeos. Na extremidade 5' possui um local interno de entrada do ribossomo (IRES) cuja função é permitir a tradução do RNA viral e uma proteína viral VPg (Virus Protein, genome linked) covalentemente ligada, na extremidade 3' tem uma cauda poli(A). O quadro de leitura aberta codifica uma única poliproteína com 2181 aminoácidos que é processada durante e após a tradução por clivagem, resultando em 12 polipeptídeos, 1 proteína líder – 4 polipeptídeos de P1 – 3 polipeptídeos de P2 e 4 polipeptídeos de P3 (Figura 5) (HALES; KNOWLES; REDDY; XU *et al.*, 2008).

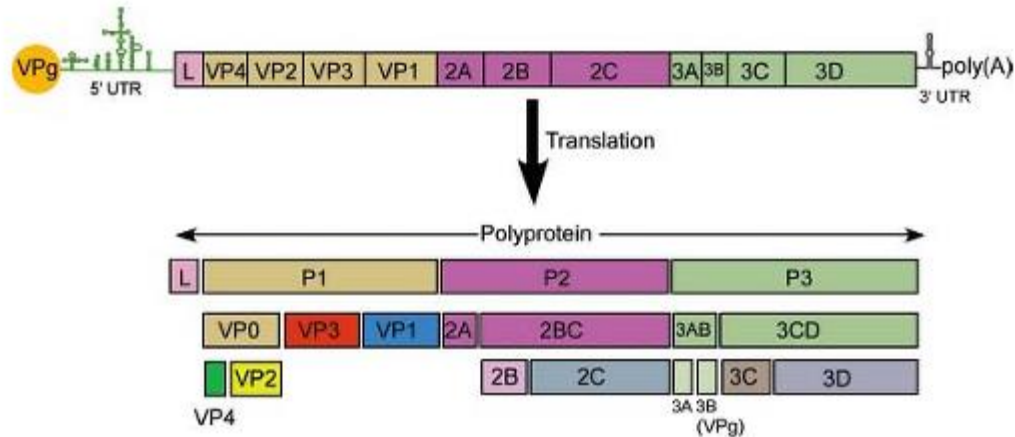


Figura 5 – Organização do genoma do picornavírus e o processamento da poliproteína. Esquema do RNA genômico, com a proteína VPg ligada ao genoma na extremidade 5', a região não traduzida de 5' que contém IRES, região que codifica a proteína, a região não traduzida de 3' contendo um pseudonó e a cauda poli(A). Fonte: (RACANIELLO, 2007)

O polipeptídeo P1 é clivado em proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral (estrutural), as proteínas do polipeptídeo P2 estão envolvidas no processamento de proteínas (não estruturais) e as proteínas do polipeptídeo P3 na replicação do genoma (não estrutural). A protease 3C é responsável por clivar a região P1 em VP0, VP3 e VP1. O VP0 quando maduro, é clivado na forma VP2 e VP4 que é encontrada em sua superfície interna (HALES; KNOWLES; REDDY; XU *et al.*, 2008; WEN; CHEN; LV; CHEN *et al.*, 2022).

A estrutura do capsídeo é composta por 60 protômeros e possui aproximadamente 30 nm de diâmetro (VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008). Cada protômero é composto por quatro proteínas estruturais VPs, dos quais, sítios antigênicos localizados nas proteínas externas do capsídeo viral (VP1, VP2 e VP3) estão envolvidos na neutralização de picornavírus (MAGGIOLI; LAWSON; DE LIMA; JOSHI *et al.*, 2018; VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008). A proteína VP4 interage com o ácido nucleico interno (VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008).

3.2. Histórico

Seneca Valley Virus-001 (SVV-001) é o mais recente membro encontrado da família *Picornaviridae*. Isolado acidentalmente em 2002, no Instituto de Terapia Genética em Gaithersburg, USA, durante o cultivo de células do retinoblastos (PER.C6), acredita-se que tenha sido introduzido via soro fetal bovino ou tripsina de origem suína contaminada (HALES; KNOWLES; REDDY; XU *et al.*, 2008). Inicialmente, devido a semelhança da sequência de aminoácidos presentes no revestimento do vírus de 35,8%, acreditava-se pertencer ao gênero *Cardiovirus* (VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008). Porém, devido as características baseadas do IRES e protease 2A, a ausência do trato interno poli (C) e outras diferenças na sequência com o gênero *Cardiovirus*, SVV-001 foi proposto representar um novo gênero *Senecavirus* (VENKATARAMAN; REDDY; LOO; IDAMAKANTI *et al.*, 2008).

Em 2007, animais transportados do Canadá para os Estados Unidos apresentaram lesões vesiculares e claudicação, após testarem negativo para outras doenças vesiculares, incluindo Febre Aftosa, amostras destes animais testaram positivo para SVA por RT-PCR (PASMA; DAVIDSON; SHAW, 2008). Em 2012, SVA foi identificada novamente nos Estados Unidos (SINGH; CORNER; CLARK; SCHERBA *et al.*, 2012).

Após o início dos surto, foi reportado nos Estados Unidos SVA pela primeira vez em uma fazenda com 300 porcas matrizes com um aumento súbito e grave da mortalidade de leitões neonatais com alta morbidade, seguido de lesões vesiculares no focinho e patas em animais adultos (CANNING; CANON; BATES; GERARDY *et al.*, 2016).

Desde 2015, a incidência de SVV-001 tem crescido em vários países. Desta forma, no mesmo ano, o comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, propôs que o vírus seja conhecido como *Senecavirus A* (SVA) (ADAMS; LEFKOWITZ; KING; BAMFORD *et al.*, 2015).

Desde janeiro de 2015, suínos no Brasil foram afetados com doença vesicular, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foi notificado e o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) realizou os testes oficiais recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OIE) em casos de doenças vesiculares que são Febre Aftosa, estomatite vesicular e doença vesicular dos suínos, com resultado negativo para todas as doenças. Um teste de PCR foi desenvolvido baseado no gene VP3/VP1, relatando os primeiros casos de SVA no Paraná e Santa Catarina, Brasil (LEME; ZOTTI; ALCANTARA; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A universidade de Minnesota, USA, recebeu amostras de Minas Gerais e Goiás, após testarem negativos para outras doenças vesiculares pelo serviço oficial, essas amostras foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) para descoberta do patógeno, o qual foi identificado compartilhar 94,2%-96,5% de nucleotídeos com o genoma de SVV-001 (VANNUCCI; LINHARES; BARCELLOS; LAM *et al.*, 2015).

Além disso, após o sequenciamento genômico completo da SVA, duas árvores filogenéticas foram construídas com a região VP1 (2550-3486 nucleotídeos), e região parcial de 3Dpol e completa 3'UTR (6834-7284 nucleotídeos), e ambas as árvores ilustraram que a cepa SVA brasileira compartilha um ancestral comum com a cepa do Canadá e dos Estados Unidos (VANNUCCI; LINHARES; BARCELLOS; LAM *et al.*, 2015). Segundo estudos realizados com as cepas isoladas nos Estados Unidos, também foi identificado semelhança genética com SVA isolada no Brasil (HAUSE; MYERS; DUFF; HESSE, 2016).

Na China a primeira identificação de SVA foi em 2015, confirmado por RT-PCR, os animais apresentavam lesões vesiculares, claudicação, alguns destes apresentaram vômito e febre, a cepa viral isolada era similar as cepas dos Estados Unidos e Brasil (WU; ZHAO; BAI; SUN *et al.*, 2017; WU; ZHAO; CHEN; HE *et al.*, 2016).

3.3. Patogenia e Sinais Clínicos

A multiplicação do vírus ocorre no citoplasma celular, geralmente observado em células da epiderme, células dendríticas das tonsilas e macrófagos em linfonodos (HOUSTON; TEMEEYASEN; PIÑEYRO, 2020).

Primeiramente o vírus penetra na célula e se liga a um receptor, em seguida, pela via endocítica o capsídeo viral é liberado no citoplasma e ocorre a liberação do genoma. A proteína VPg ligada ao genoma é removida e se inicia a tradução e produção de proteínas essenciais para a replicação do genoma. A poliproteína é clivada e produz proteínas individuais.

A síntese de RNA ocorre em vesículas, RNA de polaridade positiva é copiado pela RNA-polimerase viral para formar o RNA de polaridade negativa, que são depois copiados para produzir cópias de RNA de polaridade positiva adicionais (RACANIELLO, 2007).

No início da infecção, o RNA recém sintetizados é novamente traduzido para produzir proteínas virais adicionais. Em pontos mais tardios do ciclo, as fitas de RNA de polaridade positiva seguem para a via de montagem, denominada morfogênese. Partículas virais recém-sintetizadas são liberadas da célula por lise (RACANIELLO, 2007).

SVA está presente nos principais países de produção de suínos (CHEN; YANG; CAO; LIU *et al.*, 2018). É um vírus que sofre mutações rapidamente, a grande escala de ocorrências da doença aumentam as suas mutações e o risco de propagação (CHEN; YANG; CAO; LIU *et al.*, 2018).

O vírus já foi detectado em fezes e intestino de camundongos e amostras do ambiente e o RNA viral também foi detectado em moscas de fazendas produtoras de suínos (JOSHI; FERNANDES; CLEMENT; LAWSON *et al.*, 2016). Adicionalmente, funcionários contaminados, equipamentos de reboque e removedores de carcaças são importantes vias de introdução do vírus na fazenda (BAKER; MOWRER; CANON; LINHARES *et al.*, 2017).

Alguns estudos de inoculação experimental em suínos resultou em replicação viral e produção de anticorpos mas não induziu doença clínica (HALES; KNOWLES; REDDY; XU *et al.*, 2008; KNOWLES; HALES; JONES; LANDGRAF *et al.*, 2006).

Em um estudo de infecção experimental com suínos adultos mostrou que alguns animais podem desenvolver lesões, e outros, mesmo apresentando replicação viral e soroconversão, podem apresentar ausência de lesões vesiculares (BUCKLEY; LAGER, 2022).

Outro estudo de infecção observou-se lesões vesiculares nas patas 2 dias pós infecção (4 de 15 animais) e em todos após 5 dias de infecção (BUCKLEY; KULSHRESHTHA; VAN GEELEN; MONTIEL *et al.*, 2019). Lesões no focinho foram observados em 6 de 15 animais após 4 dias de infecção. Todos desenvolveram anticorpos neutralizantes após 7 dias de infecção. Em 14 dias a maioria já não tinha mais lesões e nem viremia, o mesmo foi observado em níveis de RNA em swab oral, com exceção da primeira semana (BUCKLEY; KULSHRESHTHA; VAN GEELEN; MONTIEL *et al.*, 2019). Níveis de RNA em swab oral apresentam pico na primeira semana pós inoculação e redução após 14 dias pós infecção (BUCKLEY; MICHAEL; FAABERG; GUO *et al.*, 2021).

Uma característica relatada no surto de SVA é a morte súbita em leitões neonatais, denominada perdas neonatais epidêmica, onde foram identificadas infecções bacterianas sistêmicas e entéricas nesses leitões (VANNUCCI; LINHARES; BARCELLOS; LAM *et al.*, 2015).

Suínos são hospedeiros naturais do vírus, em outras espécies apresentam a forma subclínica (HOUSTON; TEMEEYASEN; PIÑEYRO, 2020). As principais características de infecção por SVA em suínos incluem lesões vesiculares, perda aguda de 30% a 70% de leitões neonatais e surtos com duração entre 1 a 2 semanas (VANNUCCI; LINHARES; BARCELLOS; LAM *et al.*, 2015). Adicionalmente, os sinais clínicos podem incluir letargia, emagrecimento e diarreia, no Brasil foi observado sinais neurológicos (BAKER; MOWRER; CANON; LINHARES *et al.*, 2017; LEME; OLIVEIRA; ALCÂNTARA; HEADLEY *et al.*, 2016).

Em necropsia animais acometidos com SVA podem apresentar petéquias renais, lesões ulcerativas na língua e bandas coronárias (LEME; OLIVEIRA; ALCÂNTARA; HEADLEY *et al.*, 2016).

4. Diagnóstico

Desde que a doença vesicular causada pelo SVA é indistinguível com Febre Aftosa em suínos, casos de doenças vesiculares devem ser investigadas para descartar outras infecções, já que Febre Aftosa é uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde (OIE).

No momento, infecção por SVA é diagnosticado por RT-PCR, ensaio de soroneutralização e teste de imunofluorescência indireta (IFA) (BRACHT; O'HEARN; FABIAN; BARRETTE *et al.*, 2016; LEME; OLIVEIRA; ALCÂNTARA; HEADLEY *et al.*, 2016; YANG; VAN BRUGGEN; XU, 2012).

ELISA indireto foi desenvolvido para identificar anticorpos em soro de suínos com e sem sinais clínicos para SVA foram analisados a resposta para as proteínas VP1, VP2 e VP3. Como resultado, VP2 apresentou maior resposta de anticorpos do que VP1 e VP3 com um teste VP2 ELISA de 94,2% de sensibilidade e 89,7% de especificidade (DVORAK; AKKUTAY-YOLDAR; STONE; TOUSIGNANT *et al.*, 2016).

Um teste de ELISA competitivo utilizando anticorpos monoclonais (98,2% especificidade e 96,9% de sensibilidade) foi desenvolvido como teste de triagem e vírus neutralização (99,6% especificidade e 98,2% de sensibilidade) como teste confirmatório (GOOLIA; VANNUCCI; YANG; PATNAYAK *et al.*, 2017).

Proteínas VP1 e VP2 foram expressas e usadas para gerar oito anticorpos monoclonais (mAbs), essas mAbs mostraram resposta contra epítomos de células B lineares, sugerindo que estas duas proteínas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de detecção imunológicas (FAN; ZHU; LI; SHI *et al.*, 2020).

Teste RT-qPCR baseado na região VP1 mostrou-se eficaz para detectar RNA viral em todos os tipos de lesões vesiculares, incluindo swab oral, tecido de lesões, fígado e linfonodo (BRACHT; O'HEARN; FABIAN; BARRETTE *et al.*, 2016). Swab de lesões vesiculares apresentam grande quantidade de ácido nucleico viral, uma curta duração da viremia pode ser detectado por PCR e os animais rapidamente desenvolvem anticorpos com SVA após a infecção (BUCKLEY; KULSHRESHTHA; VAN GEELEN; MONTIEL *et al.*, 2019).

Estudos mostram a possibilidade de detecção do vírus por PCR em vários tecidos como pulmão, coração, fígado, baço, rins e intestino, nesses animais afetados (VANNUCCI; LINHARES; BARCELLOS; LAM *et al.*, 2015).

Em um surto em 2015, foi realizado RT-qPCR e ELISA baseado na proteína recombinante VP1 os quais foram possíveis detectar 100% dos animais afetados, com significativo aumento dos níveis de anticorpos durante as 3 primeiras semanas após o aparecimento de lesões vesiculares. Foi observado que a proporção de animais positivos no soro é indetectável por RT-qPCR três semanas após o início dos sinais clínicos, quando se observa maiores níveis de anticorpos (GIMENEZ-LIROLA; RADEMACHER; LINHARES; HARMON *et al.*, 2016).

III. JUSTIFICATIVA

A suinocultura vem crescendo no mundo ao longo dos anos e ganhando destaque no Brasil com a produção e exportação de carne. Manter a condição sanitária é de suma importância para que não ocorra restrições nas exportações o que poderia se tornar um grande problema econômico para o Brasil.

O SVA não havia sido relatado no Brasil até o final do ano de 2014, desde então, o número de notificações de casos de doenças vesiculares em suínos vem crescendo. De forma que as doenças vesiculares em suínos são indistinguíveis, e todas são inicialmente tratadas como suspeitos de febre aftosa, um teste diagnóstico diferencial rápido e eficaz é essencial.

O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, integrante da rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizam o teste de soroneutralização e RT-qPCR, que possuem algumas desvantagens por serem testes demorados e de alto custo, devido a necessidade de cultivo celular no primeiro teste e equipamentos e exigências técnicas elevadas. Estudos mostram que teste sorológico de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISAI) com a proteína recombinante VP2 pode ser a melhor alternativa para um teste mais rápido e eficaz, porém esta proteína não havia sido testada quanto a antigenicidade com soros de animais de propriedades que tiveram surtos de SVA no Brasil.

IV. OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Desenvolver e validar um teste diagnóstico sorológico de Ensaio Imunoenzimático Indireto baseado na proteína recombinante VP2 que identifique de forma rápida e eficaz animais infectados por *Senecavirus A* em soro de suínos provenientes de propriedades com surtos de doença vesicular no Brasil.

- Objetivos específicos

Analisar as sequências das cepas de SVA brasileiras e usar como modelo para produção da proteína recombinante alvo como antígeno no teste diagnóstico;

Produzir e purificar a proteína recombinante do gene VP2 selecionado a partir do sistema heterólogo em *Escherichia coli*;

Obter anticorpos específicos contra SVA de oito distintas cepas brasileiras;

Padronizar o teste sorológico para detecção de SVA por VP2 em Ensaio de Imunoadsorção Enzimática indireto (ELISA);

Analisar interação antígeno/anticorpo com amostras de soros de animais na fase aguda e fase crônica da doença e imunizados com diferentes cepas brasileiras.

V. ARTIGO CIENTÍFICO



The Original by FUNPEC-RP

Standardization of ELISA with Senecavirus A recombinant VP2 protein and its use in swine herds in Brazil

J.S.G. Rieger¹, C. Mantovani², P.A.P. Suniga², I.B. Pinto²,
G.A.A. Sousa², D. Gava³, M.E. Cantão³, L.R. Santos², F.R. Araújo² and
J.R. Ciacci-Zanella³

¹Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró Centro Oeste, Campo Grande, MS, Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves, Concórdia, Brasil

Corresponding author: L.R. Santos E-mail:
lenita.santos@embrapa.br

Genet. Mol. Res. 22 (1): gmr19118

Received November 22, 2022

Accepted December 18, 2022

Published January 18, 2023

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr19118>

ABSTRACT. Senecavirus A (SVA) is a nonenveloped, single-stranded RNA virus. The icosahedral viral particle is composed of four structural proteins: VP1, VP2, VP3 and VP4, among which VP2 is strongly involved in the antibody immune response. The virus causes vesicles on the snout and feet in pigs, which are clinically indistinguishable from other vesicular diseases such as foot-and-mouth disease. Outbreaks of SVA have been reported worldwide since 2014; however, its prevalence in Brazil remains unknown. In this study, the VP2 structural protein was produced and purified from *E. coli*, and recombinant VP2 (rVP2), based on the most recent Brazilian strain, was used to develop an indirect ELISA to identify antibodies against SVA in Brazilian swine herds. Sensitivity and specificity values of the rVP2 ELISA were determined using receiver operating characteristic analysis performed on 43 SVA positive and 219 negative serum samples. In addition, serum samples from pigs immunized with eight distinct Brazilian SVA inactivated strains were tested with the rVP2 ELISA. For the specificity of the assay,

17 serum samples from vesicular stomatitis virus (VSV) from naturally infected pigs were tested. The rVP2 ELISA was found to have 100% specificity and 74.4% sensitivity. The performance of the assay using samples collected during the SVA outbreak, had a sensitivity of 100%, and with those collected nine months after the outbreak it had a sensitivity of 73.4%. The rVP2 ELISA developed here was able to detect specific SVA antibodies in acute disease and recovered pigs, and no cross-reactivity with VSV was observed. This assay has potential as a useful tool for monitoring SVA infection and could help to improve disease diagnosis.

Key words: Enzyme-linked immunosorbent assay; Serology; Diagnostics; Seneca valley virus; SVV; SVA

INTRODUCTION

Senecavirus A (SVA), also known as Seneca Valley virus, is composed of an icosahedral capsid with positive-sense single-stranded RNA; it belongs to the *Senecavirus* genus, *Picornaviridae* family (Hales et al., 2008; Adams et al., 2015). The virus was first described in 2002, as a cell contaminant in human retinoblast cells (PER.C6®), presumably introduced via porcine trypsin or fetal bovine serum (Hales et al., 2008). In retrospective studies, SVA was detected in 1988 from samples of healthy pigs in the U.S., but its first association with vesicular disease (VD) was reported in 2007 in the U.S. (Pasma et al., 2008). Outbreaks of VD associated with SVA have been reported since 2014 and the incidence of SVA infections has increased in several countries, such as China (Qian et al., 2016; Wu et al., 2017), the U.S. (Canning et al., 2016, Preis et al., 2022), and Brazil (Leme et al., 2015; Vannucci et al., 2015; Vieira et al., 2022). A retrospective serological survey conducted in Brazil suggested that the virus was not circulating prior to 2014 (Saporiti et al., 2017).

SVA causes an acute VD in pigs, characterized by vesicles and erosions on the snout, oral cavity and coronary band. Acute loss between 30-70% of neonatal piglets associated mainly with claudication, lethargy, neurological signs and/or diarrhea has been reported (Vannucci et al., 2015; Zhang et al., 2018, Houston et al., 2020). A major concern about SVA-VD is that it is clinically indistinguishable from other VDs, such as foot-and-mouth disease (FMDV), swine vesicular disease (SVD), vesicular stomatitis (VS) and vesicular exanthema of swine (VES) (Leme et al., 2015; Segales et al., 2017; Liu et al., 2020). Identification of SVA infection helps to rule out mainly FMDV, an economically devastating disease (Zhang et al., 2018).

The SVA genome is 7280 nucleotides long, with an open reading frame encoding a single polyprotein. It is structured by the standard L-4-3-4 picornaviruses layout: a leader protein, four polypeptides of P1 (structural), three polypeptides of P2 and four polypeptides of P3 (nonstructural) (Hales et al., 2008). The 3C protease is responsible for cleaving the P1 region into VP0, VP3 and VP1. The VP0, when mature, is cleaved in VP2 and VP4 forms that are found in the inner surface (Racaniello, 2007; Hales et al., 2008; Wen et al., 2022). The antigenic sites are located in VP's external viral capsid proteins (VP1, VP2 and VP3), which are involved in the neutralization of picornaviruses (Maggioli et al., 2018). Among these VP proteins, VP2 showed to be an ideal target for the specific detection of SVA

antibodies as it is more conserved and immunogenic than VP1 and VP3 (Dvorak et al., 2017). This study aimed to develop and standardize an indirect ELISA based on a recombinant VP2 (rVP2) of SVA to detect antibodies against the virus in Brazilian pig herds.

MATERIAL AND METHODS

SVA protein selection

A total of 51 Brazilian Senecavirus sequences were retrieved from Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); however, only 14 sequences (GenBank accession numbers: KR063107, KR0631008, KR063109, MF615501, MF615502, MF615503, MF615504, MF615505, MF615506, MF615507, MF615508, MF615509, MF615510, and MZ456812), which presented the full length genome, were used in the study. As VP2 has been shown to be the viral protein with a higher antibody response (Dvorak et al., 2017) and has more epitopes for antibody recognition (Yang et al., 2007), it was selected to be the target in this study. From the viral polyprotein, the full-length VP2 gene, composed of 852 nucleotides, was identified based on its respective cleavage sites (Hales et al., 2008). To determine the consensus sequence of the VP2 gene, the 14 nucleotide sequences were aligned using the PRRN online program (<https://www.genome.jp/tools-bin/prrn>). As the consensus sequence generated too many degenerate bases, the sequence MZ456812 (BRMSA 2598 - SISGEN A91DB6D) was selected. This sequence was chosen because it represents the most recent Brazilian SVA circulating in Brazil and is available on GenBank. This virus was isolated from a SVA outbreak that occurred at Embrapa Suínos e Aves swine facility, in Santa Catarina State in 2020, under the official veterinary service investigation.

VP2 3D modeling and epitope identification

The 14 Brazilian VP2 SVA amino acid sequences were aligned for the generation of the 3D model and the identification of epitopes. The three-dimensional model of VP2 was constructed using the PyMol software. The conserved epitopes were identified based on a previous study of Fan et al. (2020). The epitopes sites were colored on the 3D model and marked on the sequence alignment.

Expression and production of the rVP2

The VP2 full length gene sequence of SVA was optimized, synthesized, and ligated into pET-28a(+) plasmid (Novagen, USA) for expression in *E. coli*. The plasmid pET28a-VP2 was introduced into competent *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Fisher Scientific, USA) for culture. Gene expression was induced by incubation of liquid 2yt supplemented with 1mM de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Thermo Fisher Scientific, USA) for 3 h at 37°C.

The recombinant protein was solubilized with 8M urea and purified using nickel affinity chromatography by modifying the centrifugation method to a gravitational method (Probond Resin, Thermo Fisher Scientific, USA) following and adapting the manufacturer's instructions. The recombinant protein was dialyzed with 1x phosphate-buffered saline at pH

7.2 (PBS) for 72 h at 4°C. Purification and sample quality was performed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 12% (SDS-PAGE) and Western blotting, by using an anti-6x-histidine monoclonal antibody (Sigma, USA). The concentration of protein was measured by the Bradford method (Bradford, 1976).

Swine serum samples

A total of 43 serum samples from SVA-VD affected pigs were tested. From these, 23 positive serum samples were obtained from sows naturally infected with SVA from the outbreak in which the isolated MZ456812 was used for VP2 protein design. Serum samples were collected during the acute phase of the infection (seven days after the beginning of vesicular lesions on the snout and coronary band - 7 DPI) (n= 8 - Group A) and after the convalescent phase (nine months after the outbreak - 9 MPI) (n= 15 - Group B). In addition, positive pig serum samples collected during the acute phase (2 to 15 DPI) (n= 20 - Group C), which were confirmed by serum virus neutralization (SVN), were obtained from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA).

Negative swine serum samples (n= 219 - Group D) were randomly selected from a serum database at the Embrapa Swine and Poultry institute, from pigs of different ages and Brazilian states from 1990-2012, before the emergence of SVA around the world.

In addition, to verify the specificity of the assay, 17 serum samples from VSV naturally infected sows (Group E), which were positive by SVN to VSV under official investigation by MAPA, were tested. These samples were obtained from Bahia state in 2020, from sows showing vesicular clinical signs.

Experimental SVA immunization

Eight distinct Brazilian SVA strains (GenBank accession numbers: MF615501, MF615502, MF615503, MF615505, MF615506, MF615507, MF615509, and MZ456812) containing 10^6 50% Tissue Culture Infectious Dose per mL (TCID₅₀/mL) in H1299 non-small lung carcinoma cell line (ATCC CRL-5803) was used for serum production. The SVA isolates were inactivated with binary ethylenimine as previously described (Bahnemann, 1990) and 20% Emulsigen as an adjuvant (MVP Laboratories Inc., USA) was added to the preparation.

To obtain specific antibodies against SVA, eight specific pathogen-free pigs 40-days-old were intramuscularly immunized with 2 mL of an inactivated SVA preparation. Three boosters were administered two weeks apart and blood was collected from each pig 15 days after the final booster. The sera were obtained (n= 8 - Group F) and stored at -20°C until analysis.

RT-qPCR and serum virus neutralization assays for SVA

The official veterinary service was notified of an occurrence of VD and the SVA infection was confirmed by RT-qPCR in vesicular fluid and associated epithelium. Viral RNA was extracted from 50 µL of vesicular fluid and serum (from the outbreak) and of infected H1299 cells (SVA isolates) using the magnetic particle processor procedure (MagMAX™-96 Viral RNA Isolation kit, Applied Biosystems, USA). RT-qPCR was

performed using a commercial SVA RT-qPCR reagent targeting the conserved SVA 3D polymerase region (EZ-SVA, Tetracore Inc., USA).

For the serum virus neutralization assay (SVN), serial two-fold dilutions of heat-inactivated positive and hyperimmune sera (1:40 to 1:40,960) were incubated for 1 h at 37°C with 200 TCID₅₀/mL of each SVA strain. H1299 cells were added to each well in a 96-well plate and after 48 h of incubation at 37°C with 5% CO₂, were fixed with 3.7% formaldehyde. Cells were permeabilized with 0.2% Triton-X and incubated with primary antibody (anti-SVA rabbit polyclonal antibody - gently provided by Dr Diego G. Diel) diluted 1:3,000 for 1 h at 37°C. Then, goat anti-rabbit IgG (H+L) highly cross-adsorbed secondary antibodies - Alexa 594 conjugated (Thermo Fisher Scientific, USA) diluted 1:1,200 were incubated for 1 h at 37°C. Plates were read under a fluorescence microscope and antibody titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum capable of completely inhibiting SVA replication.

VP2 antibody detection by rVP2 SVA ELISA

Polystyrene 96 well plates (Costar, ref 3590, USA) were absorbed with purified rVP2 previously solubilized in 2% sodium dodecyl sulfate (Lechtzier et al., 2002). The rVP2 was serially diluted from 20 to 0.0195 µg/mL in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer at a pH of 9.6 and incubated in a humid chamber overnight at 4°C. The plates were blocked with 200 µL/well of 5% skim milk in phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20 (PBST) for 1 h at 37°C. The plates were washed five times with PBST. After this, a pool of serum samples from SVA positive pigs (Group A, B and F) and a pool of serum samples from negative pigs (Group D) were diluted 1:100 and incubated for 1 h at 37°C. To evaluate the antigen-antibody interaction, the anti-IgG pig antibody conjugated with peroxidase (Sigma, USA) was tested in three dilutions (1:50,000; 100,000; and 150,000) in PBST. The enzymatic reactions were revealed with 100 µL/well of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB - Sigma, USA) for 15 minutes and interrupted by adding 50 µL/well of H₂SO₄ 2M. The optical densities were determined by spectrometry in an ELISA reader with a 450 nm filter.

To titrate the SVA positive serum samples, the rVP2 SVA ELISA was carried out following the standardized steps and diluting the pig serum from 1:100 up to 1:6,400 in PBST. ELISA absorbances were normalized to minimize the effect of intra-assay and inter-assay variation according to Ramanakumar et al. (2010).

VP2 antibody detection by Western blotting

Positive samples were confirmed by Western blotting. The recombinant VP2 protein was transferred from SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes by electrophoretic elution. SVA positive serum diluted 1:100 was added and incubated for 1 h at room temperature, followed by adding protein A conjugate for 1 h at room temperature (Sigma, USA). The reveal was done using a 3'3'-Diaminobenzidine (DAB) reagent (Sigma, USA).

Statistical analysis

The diagnostic accuracy of the assay was performed by using the software Epitools Epidemiological Calculators (<https://epitools.ausvet.com.au/roccurves>) which applies the curve ROC analysis to measure the variation in sensitivity and specificity of the antigen tested by ELISA. The area under the ROC curve (AUC) was determined, which is an effective way to summarize the overall diagnostic accuracy that gives values between 0-1, where a value more than 0.9 is considered an outstanding accurate test and 1 is perfect (Mandrekar, 2010).

The Youden Index (J) was used to evaluate the maximum potential effectiveness of the VP2. It is considered the main summary statistic of the ROC curve, with the ability to differentiate when the sensitivity and the specificity have equal weight.

The graphs were designed using GraphPad Prism, version 6 for Windows (GraphPad®).

RESULTS

VP2 3D modeling and epitope identification

The VP2 layout presented one conformation in α -helix on the epitope ¹²DRVITQT¹⁸ (red), two β -sheet conformations on the epitopes ⁹⁸GGAFTA¹⁰³ (green) and ¹⁵⁰KSLQELN¹⁵⁶ (magenta), and two loops on the epitopes ⁷¹WTKAVK⁷⁶ (yellow) and ²⁴⁸YKEGAT²⁵³ (blue). As loops are disposed on the surface of the VP2, they are more likely exposed to the action of solvents or to the interaction with biological molecules, which could explain the epitope location matching with these regions (Figure 1A).

The VP2 amino acids alignment of the 14 Brazilian SVA sequences showed five epitope regions (¹²DRVITQT¹⁸, ⁹⁸GGAFTA¹⁰³, ¹⁵⁰KSLQELN¹⁵⁶, ⁷¹WTKAVK⁷⁶ and ²⁴⁸YKEGAT²⁵³), which were marked with colored boxes (Figure 1B). In total, five mutations were identified, which were highlighted in orange. The SVA sequence selected for VP2 synthesis (MZ456812), showed 4/284 mutations (K42R, S70P, T180A and T280A), all of them located outside of an epitope region; while a SVA sequence from 2016 (MF615505) showed one mutation (I15M) located on the epitope DRVITQT. However, this unique mutation did not interfere with the performance of the rVP2 SVA ELISA using the corresponding serum.

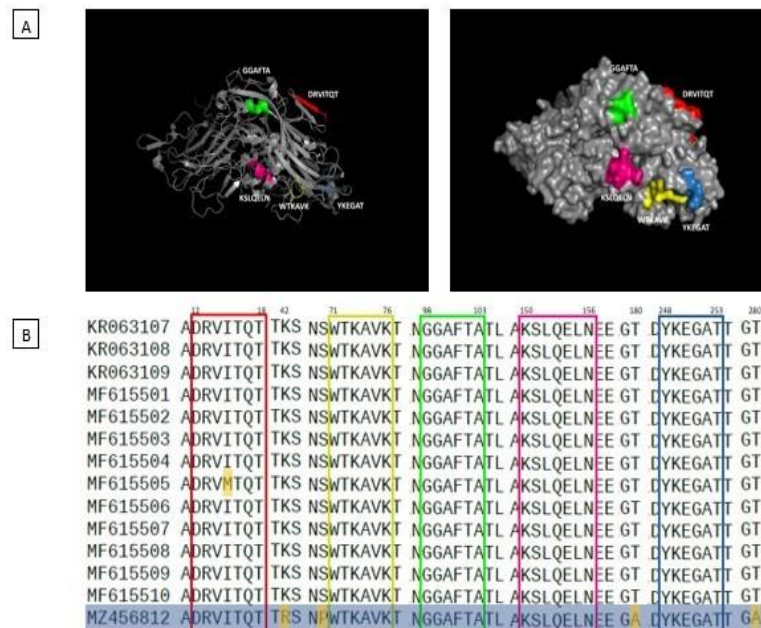


Figure 1. Analysis of VP2 epitopes and mutations of SVA amino acid sequences. (A) Simulated 3D model of VP2. The epitopes are colored as follows: ¹²DRVITQT¹⁸ (red), ⁹⁸GGAFTA¹⁰³ (green), ¹⁵⁰KSLQELN¹⁵⁶ (magenta), ⁷¹WTKAVK⁷⁶ (yellow), and ²⁴⁸YKEGAT²⁵³ (blue). (B) VP2 amino acid sequences of the 14 Brazilian SVA, in which colored boxes indicate the corresponding epitope regions. The strain MZ456812, the focus of this study, is highlighted in blue. All mutations are marked in orange.

rVP2 protein expression

The rVP2 protein was expressed and determined through electrophoresis in SDS- PAGE, which revealed a mass of approximately 35 kilodaltons (kDa) for the recombinant protein after purification (Figure 2A). In Western blotting, the rVP2 protein was recognized by the anti-6x-histidine antibody, which confirmed the gene expression (Figure 2B). Then, swine positive (Group A) and negative SVA (Group D) sera were tested by Western blotting. The positive serum showed a strong signal at the expected 35 kDa size, corresponding to VP2 (Hales et al. 2008; Houston et al. 2020) (Figure 2C).

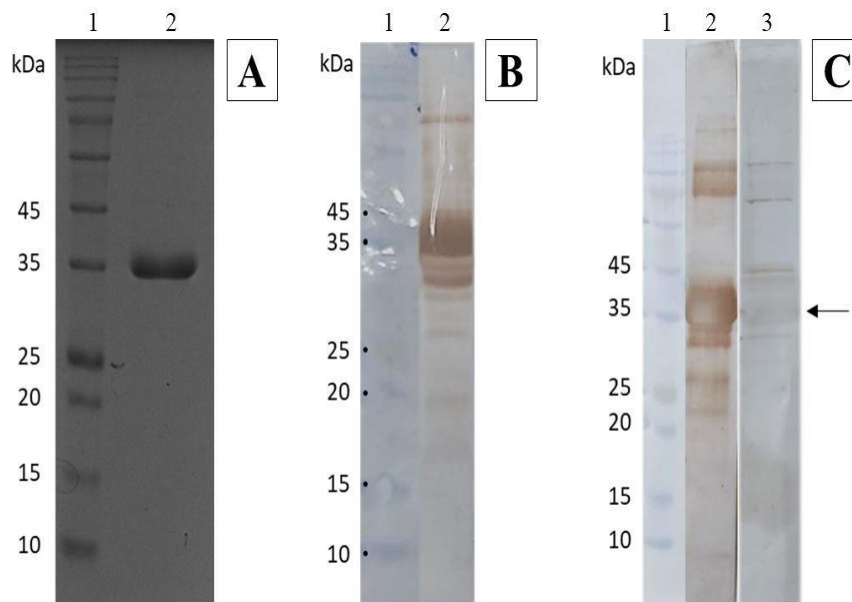


Figure 2. Purification and confirmation of SVA rVP2 protein in SDS-PAGE and Western blotting. (A) rVP2 purified: Lane 1 - protein marker - Sinapse (S2600). Lane 2 - rVP2 after purification (ProBond). (B) Western blotting with anti-histidine: Line 1 - protein marker - Sinapse (S2600). Line 2 - rVP2 recognized by the anti-6x- histidine antibody. (C) - Western blotting with SVA positive and negative pig serum: Line 1 - protein marker - Sinapse (S2600). Line 2 - VP2 signal in a positive serum. Line 3 - absence of VP2 signal in a negative serum.

rVP2 ELISA optimization and validation

The rVP2 ELISA was standardized with 500 ng/well of rVP2 to coat the plates, serum samples dilution of 1:100 and secondary antibody conjugated with peroxidase dilution of 1:1000,000. The cut-off value was determined using ROC analysis, performed with 262 samples, among which 43 were positive (Group A, B and C) and 219 were negative (Group D) for SVA. The results of the ROC analysis are shown in Table 1. There were no large changes in the sensitivity values according to different specificity levels. Assuming a specificity of 100%, we used a cut-off value of OD = 0.549, showing an area under the curve (AUC) of 0.965, and a sensitivity of 74.4% (Table 2; Figure 3A).

Table 1. Analysis of the sensitivity and specificity values (in %) of the rVP2 SVA ELISA at different cut-off points.

Parameters	Cut-off points						
	0.549	0.54	0.54	0.53	0.511	0.476	0.434
Specificity	100	99.5	99.1	98.2	95.4	90.4	80.4
Sensitivity	74.4	76.7	76.7	76.7	79.1	90.7	97.7

When the ROC analysis was applied separately, the positive samples from 7 DPI (Group B) and 9 MPI (Group C) along with negative samples (Group D), the cut-off values for that data were 0.728 and 0.551, resulting in AUC= 1 and AUC= 0.94 respectively (Table 2). Assuming a specificity of 100%, the sensitivity was 100% for Group B and 73.3% for Group C (Table 2; Figure 3B and 3C).

Table 2. ROC curve parameters of rVP2 SVA ELISA, according to the different serum samples grouped by SVA status of infection.

Samples	Cut-off points	Specificity	Sensitivity	AUC (IC 95%)	Youden's statistic
Groups A-D (n= 262)	0.549	100%	74.4%	0.965(0.936-0.995)	0.721
Groups A and D - 7 DPI (n= 227)	0.728	100%	100%	1 (1-1)	1
Groups B and D - 9 MPI (n= 234)	0.551	100%	73.3%	0.94(0.836-1)	0.733

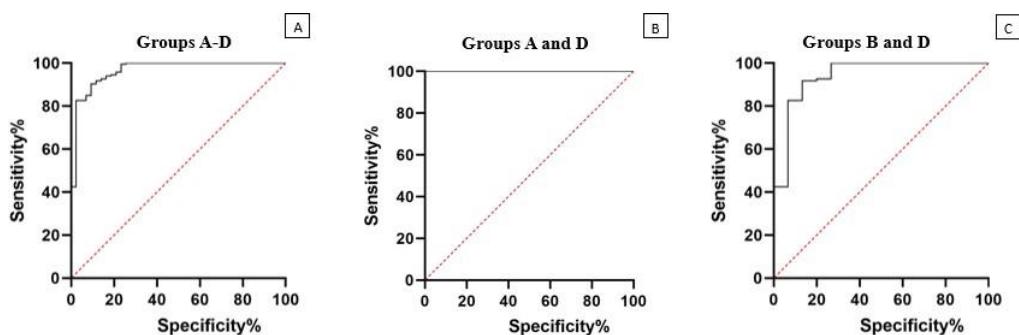


Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve of rVP2 SVA ELISA with a confidence interval of 95%. (A) ROC curve with 43 positive samples (Groups A, B and C) and 219 negative samples (Group D) (AUC=0.965). (B) ROC curve with eight positive samples of 7 DPI (Group A) and 219 negative samples (Group D) (AUC=1). (C) ROC curve with 15 positive samples of 9 MPI (Group B) and 219 negative samples (Group D) (AUC=0.94).

Positive serum samples showed OD absorbance above the cut-off (Figure 4A), which was confirmed by IgG titer analyses. The IgG titers varied from 100 to 1,600 (Figure 4B). Positive samples for VSV (Group E) showed no cross-reactivity in the SVA VP2 ELISA (Figure 4C).

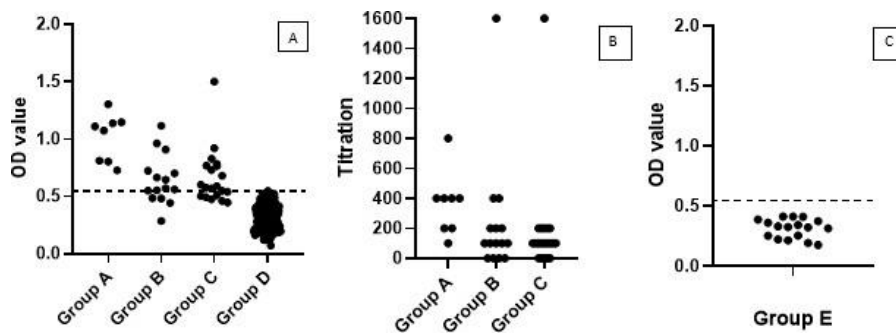


Figure 4. Analysis of rVP2 SVA ELISA with SVA positive and negative serum samples. The cut-off value for the assay is shown by the dashed line (0.549) (A) OD values for 43 SVA positive samples (Groups A, B and C) and 219 negative samples (Group D) (B) IgG SVA titers for 43 SVA positive samples (Groups A, B and C). (C) Seventeen pig serum samples were positive for VSV.

Experimental immunization analysis

Eight distinct inactivated SVA strains were administered in pigs to obtain specific antibodies against SVA. Serum samples collected from pigs before and after three boosters were tested by rVP2 SVA ELISA. From the eight Brazilian SVA strains, four were able to stimulate specific immune responses against the recombinant VP2 protein: MF615506, MF615507, MF615502, and MF615505 (Figure 5).

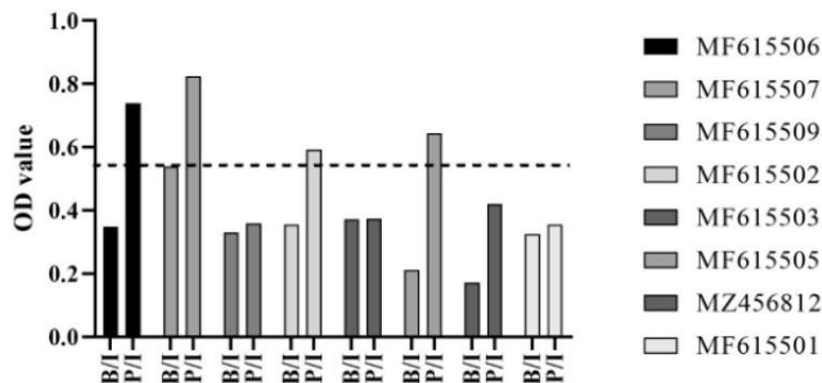


Figure 5. Analysis of rVP2 SVA ELISA of serum from eight pigs immunized with inactivated Brazilian SVA strains. The cut-off value for the assay is shown by the dashed line (0.549). B/I = Before Immunization, P/I = Post Immunization.

Comparison of rVP2 SVA ELISA and SVN/RT-PCR

Twenty-eight serum samples from Group C (n= 20) and Group F (n= 8), previously positive for SVA antibodies by SVN were tested by the rVP2 ELISA. Twenty out of 28 samples (71.43%) were positive in both assays (Figure 6).

Twenty-three SVA RT-PCR positive serum samples collected during the SVA outbreak, from Group A (n= 8) and B (n= 15), were also tested by the rVP2 ELISA. Nineteen of the 23 samples were positive in both assays, despite that the RT-PCR corresponds to virus detection and the ELISA indicates antibody response to virus infection (Figure 6).

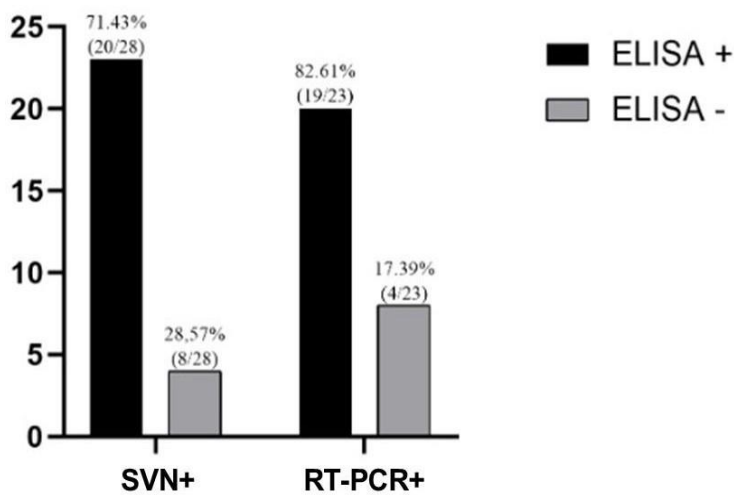


Figure 6. Comparison of rVP2 SVA ELISA with SVN and its correlation with SVA RT-PCR detection.

DISCUSSION

Senecavirus A is an emerging virus, associated with vesicular disease in swine. It poses a major concern because of the clinical similarity with other VD, particularly with FMD, a World Organisation for Animal Health listed disease (Houston et al. 2020). Outbreaks of SVA-VD have been reported in several swine-producing countries around the world since 2014 (Leme et al., 2015; Vannucci et al., 2015; Canning et al., 2016; Qian et al., 2016; Wu et al., 2017). In Brazil, the disease was characterized as the presence of vesicles and coalescing erosions on snout, oral cavity and coronary bands in different pig categories and as acute loss of neonatal piglets in the first days of age (Leme et al., 2015; Vannucci et al., 2015; Leme et al., 2017). This resemblance with FMD, losses due to piglet mortality, and other economic impact on the pig production, highlights the importance of SVA infection (Zhang et al., 2018). As some pigs can be infected and shed SVA without showing any clinical disease (Segales et al., 2017; Houston et al., 2020) a SVA specific antibody detection assay is crucial to minimize the impact of the disease (Zhang et al., 2018).

SVA has a short-term viremia, from 1-10 days, which occurs along with the production of neutralizing antibodies (nAb) (Joshi et al., 2016; Maggioli et al., 2018). Virus-specific nAb are important to control viremia, limit SVA spread to tissues and to reduce the severity of disease (Dotzauer and Kraemer, 2012). This early and robust nAb production coincides with VP2 and VP3 specific IgM antibodies at 5 DPI, followed by IgG

antibodies production around 7 DPI (Joshi et al., 2016; Maggioli et al., 2018). Notably, as SVA nAb begins to be produced, viremia starts to decrease, and the complete clinical resolution usually occurs in 2-3 weeks (Maggioli et al., 2018).

Currently, several SVA antibody detection methods are available, such as indirect immunofluorescence (IF), virus neutralization assays and enzyme-linked immunosorbent assays, targeting different SVA structural proteins, including VP1, VP2, and VP3 (Gimenez-Lirola et al., 2016; Dvorak et al., 2017; Goolia et al., 2017; Bai et al., 2021). Among the three SVA structural proteins, VP2 showed higher antibody responses than VP1 and VP3 and showed higher affinity binding on an avidity ELISA (Dvorak et al., 2017). Antigenic sites are located mainly within the external viral capsid proteins, although VP2 is the capsid protein that presents more epitope site recognition (Yang et al., 2007; Fan et al., 2020). Here we analyzed those epitopes and verified that they are conserved among Brazilian VP2 SVA sequences, as mentioned previously (Fan et al., 2020).

The rVP2 SVA ELISA developed here, showed to be specific (100%) and sensitive (74.4%) in detecting SVA antibodies in the pig population, regardless of infection status. Notably, no cross-reactivity with VSV positive serum samples was observed. A previous study based on a VP2 ELISA demonstrated a specificity and sensibility of 94.2% and 89.7%, respectively (Dvorak et al., 2017). As expected, a good correlation was identified between SVN and rVP2 SVA ELISA, and the ELISA is more cost-effective and less labor consuming than SVN.

In conclusion, the rVP2 SVA ELISA developed in this study was able to detect specific SVA antibodies. This assay can be a useful tool for monitoring SVA infection and could help to improve the disease diagnosis. The rVP2 protein synthesized and expressed here can also be used to generate monoclonal antibodies that could be applied in future diagnosis methodologies for SVA detection.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, grant number 20.21.10.006.00.00.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Adams M, Lefkowitz E, King A, Bamford D, et al. (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). *Arch. Virol.* 160: 1837-1850.
- Bai M, Wang R, Sun S, Zhang Y, et al. (2021). Development and validation of a competitive ELISA based on virus-like particles of serotype Senecavirus A to detect serum antibodies. *AMB Express.* 11(1): 7.
- Bahnemann HG (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine.* 8(4): 299-303.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Canning P, Canon A, Bates J, Gerardy K, et al. (2016). Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a US sow farm. *Transbound. Emerg. Dis.* 63(4): 373-378.
- Dotzauer A and Kraemer L (2012). Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: an overview. *World J. Virol.* 1(3): 91.

- Dvorak CM, Akkutay-Yoldar Z, Stone SR, Tousignant SJ, et al. (2017). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine. *BMC Vet. Res.* 13(1): 50.
- Fan H, Zhu H, Li S, Shi M, et al. (2020). Identification of linear B cell epitopes on VP1 and VP2 proteins of Senecavirus A (SVA) using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 247: 108753.
- Gimenez-Lirola LG, Rademacher C, Linhares D, Harmon K, et al. (2016). Serological and molecular detection of Senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality. *J. Clin. Microbiol.* 54(8): 2082-2089.
- Goolia M, Vannucci F, Yang M, Patnayak D, et al. (2017). Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29(2): 250-253.
- Hales LM, Knowles NJ, Reddy PS, Xu L, et al. (2008). Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J. Gen. Virol.* 89(5): 1265-1275.
- Houston E, Temeeyasen G and Piñeyro PE (2020). Comprehensive review on immunopathogenesis, diagnostic and epidemiology of Senecavirus A. *Virus Res.* 286: 198038.
- Joshi LR, Fernandes, MH, Clement T, Lawson S, et al. (2016). Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. *J. Gen. Virol.* 97(12): 3267-3279.
- Lechtzier V, Hutoran M, Levy T, Kotler M, et al. (2002). Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. *J. Immunol. Methods.* 270(1): 19-26.
- Leme R, Zotti E, Alcantara B, Oliveira M, et al. (2015). Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transbound. Emerg. Dis.* 62(6): 603-611.
- Leme RA, Alfieri AF and Alfieri AA (2017). Update on Senecavirus infection in pigs. *Viruses.* 9(7): 170.
- Liu F, Wang Q, Huang Y, Wang N, et al. (2020). A 5-year review of Senecavirus A in China since its emergence in 2015. *Front. Vet. Sci.* 7: 567792.
- Maggioli MF, Lawson S, de Lima M, Joshi LR, et al. (2018). Adaptive immune responses following Senecavirus A infection in pigs. *J. Virol.* 92(3): e01717.
- Mandrekar JN (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J. Thorac. Oncol.* 5(9): 1315-1316.
- Pasma T, Davidson S and Shaw SL (2008). Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can. Vet. J.* 49(1): 84.
- Preis G, Sanhueza JM, Vilalta C, Vannucci FA, et al. (2022). Senecavirus A seroprevalence and risk factors in United States pig farms. *Front. Vet. Sci.* 9: 1011975.
- Qian S, Fan W, Qian P, Chen H and Li X (2016). Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016. *Virol. J.* 13(1): 173.
- Racaniello VR (2007). Picornaviridae, the virus and their replication. *Fields Virol.* 795-838.
- Ramanakumar AV, Thomann P, Candeias JM, Ferreira S, et al. (2010). Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 48(3): 791-796.
- Saporiti V, Fritzen JT, Feronato C, Leme RA, et al. (2017). A ten years (2007-2016) retrospective serological survey for Seneca Valley virus infection in major pig producing states of Brazil. *Vet. Res. Commun.* 41(4): 317-321.
- Segales J, Barcellos D, Alfieri A, Burrough E, and Marthaler D (2017). Senecavirus A: an emerging pathogen causing vesicular disease and mortality in pigs? *Vet. Pathol.* 54(1): 11-21.
- Vannucci FA, Linhares D, Barcellos D, Lam H, et al. (2015). Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 62(6):589-593.
- Vieira MV, Yasumitsu CY, Dall Agnol AM, Leme RA, et al. (2022). The third wave of Seneca Valley virus outbreaks in pig herds in southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 53(3): 1701-1706.
- Wen W, Chen X, Lv Q, Chen H, et al. (2022). Identification of a conserved neutralizing epitope in Seneca Valley virus VP2 protein: new insight for epitope vaccine designment. *Virol. J.* 19(1): 65.
- Wu Q, Zhao X, Bai Y, Sun B, et al. (2017). The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(5): 1633-1640.
- Xu W, Hole K, Goolia M, Pickering B, et al. (2017). Genome wide analysis of the evolution of Senecavirus A from swine clinical material and assembly yard environmental samples. *PLoS One.* 12(5): e0176964.
- Yang M, Clavijo A, Suarez-Banmann R and Avalo R (2007). Production and characterization of two serotype independent monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115(1-2): 126-134.
- Zhang X, Zhu Z, Yang F, Cao W, et al. (2018). Review of Seneca Valley virus: a call for increased surveillance and research.

VI. CONCLUSÕES GERAIS

A proteína VP2 é altamente conservada e sua forma recombinante mantém a antigenicidade.

A alta especificidade do teste confirma a confiabilidade para a detecção de animais verdadeiramente positivos.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto baseado nesta proteína é capaz de detectar a presença e os níveis de anticorpos em animais infectados com SVA especialmente na fase aguda da doença.

Quatro distintas cepas brasileiras inativadas são capazes de induzir anticorpos específicos contra VP2 produzida neste estudo.

O teste não apresenta reação cruzada com amostras de animais infectados com estomatite vesicular, sendo possível utilizar este teste como ferramenta útil no monitoramento da doença em rebanho suíno.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, 2021. Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em: < [Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf \(abpa-br.org\)](#)>. Acesso em: 01 de dez de 2022.

ADAMS, M.; LEFKOWITZ, E.; KING, A.; BAMFORD, D. *et al.* Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). : Springer 2015.

BAKER, K.; MOWRER, C.; CANON, A.; LINHARES, D. *et al.* Systematic epidemiological investigations of cases of Senecavirus A in US swine breeding herds. **Transboundary and emerging diseases**, 64, n. 1, p. 11-18, 2017.

BRACHT, A. J.; O'HEARN, E. S.; FABIAN, A. W.; BARRETTE, R. W. *et al.* Real-time reverse transcription PCR assay for detection of Senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens. **PLoS One**, 11, n. 1, p. e0146211, 2016.

BUCKLEY, A.; KULSHRESHTHA, V.; VAN GEELLEN, A.; MONTIEL, N. *et al.* Experimental Seneca Valley virus infection in market-weight gilts. **Veterinary microbiology**, 231, p. 7-10, 2019.

BUCKLEY, A.; LAGER, K. Infectious dose of Senecavirus A in market weight and neonatal pigs. **Plos one**, 17, n. 4, p. e0267145, 2022.

BUCKLEY, A. C.; MICHAEL, D. D.; FAABERG, K. S.; GUO, B. *et al.* Comparison of historical and contemporary isolates of Senecavirus A. **Veterinary Microbiology**, 253, p. 108946, 2021.

CANNING, P.; CANON, A.; BATES, J.; GERARDY, K. *et al.* Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a US sow farm. **Transboundary and emerging diseases**, 63, n. 4, p. 373-378, 2016.

CARGNELUTTI, J. F.; OLINDA, R. G.; MAIA, L. A.; DE AGUIAR, G. M. *et al.* Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 26, n. 6, p. 788-794, 2014.

CHEN, P.; YANG, F.; CAO, W.; LIU, H. *et al.* The distribution of different clades of Seneca Valley viruses in Guangdong Province, China. **Virologica Sinica**, 33, n. 5, p. 394-401, 2018.

DE OLIVEIRA, A. M.; JÚNIOR, A. A. F.; CAMARGOS, M. F.; ORZIL, L. M. *et al.* Development and validation of rt-qpcr for vesicular stomatitis virus detection (Alagoas vesiculovirus). **Journal of virological methods**, 257, p. 7-11, 2018.

DVORAK, C. M.; AKKUTAY-YOLDAR, Z.; STONE, S. R.; TOUSIGNANT, S. J. *et al.* An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine. **BMC veterinary research**, 13, n. 1, p. 1-6, 2016.

FAN, H.; ZHU, H.; LI, S.; SHI, M. *et al.* Identification of linear B cell epitopes on VP1 and VP2 proteins of Senecavirus A (SVA) using monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, 247, p. 108753, 2020.

GIMENEZ-LIROLA, L. G.; RADEMACHER, C.; LINHARES, D.; HARMON, K. *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**, 54, n. 8, p. 2082-2089, 2016.

GOOLIA, M.; VANNUCCI, F.; YANG, M.; PATNAYAK, D. *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**, 29, n. 2, p. 250-253, 2017.

HALES, L. M.; KNOWLES, N. J.; REDDY, P. S.; XU, L. *et al.* Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. **Journal of general virology**, 89, n. 5, p. 1265-1275, 2008.

HAUSE, B. M.; MYERS, O.; DUFF, J.; HESSE, R. A. Senecavirus a in pigs, United States, 2015. **Emerging infectious diseases**, 22, n. 7, p. 1323, 2016.

HOUSTON, E.; TEMEEYASEN, G.; PIÑEYRO, P. E. Comprehensive review on immunopathogenesis, diagnostic and epidemiology of Senecavirus A. **Virus Research**, 286, p. 198038, 2020.

JOSHI, L. R.; FERNANDES, M. H.; CLEMENT, T.; LAWSON, S. *et al.* Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs. **Journal of general virology**, 97, n. 12, p. 3267-3279, 2016.

KNOWLES, N. J.; HALES, L. M.; JONES, B. H.; LANDGRAF, J. G. *et al.* Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. **Northern Lights EUROPIIC**, 2006.

LEME, R.; ZOTTI, E.; ALCANTARA, B.; OLIVEIRA, M. *et al.* Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and emerging diseases**, 62, n. 6, p. 603-611, 2015.

LEME, R. A.; OLIVEIRA, T. E.; ALCÂNTARA, B. K.; HEADLEY, S. A. *et al.* Clinical manifestations of Senecavirus A infection in neonatal pigs, Brazil, 2015. **Emerging infectious diseases**, 22, n. 7, p. 1238, 2016.

MAGGIOLI, M. F.; LAWSON, S.; DE LIMA, M.; JOSHI, L. R. *et al.* Adaptive immune responses following Senecavirus A infection in pigs. **Journal of virology**, 92, n. 3, p. e01717-01717, 2018.

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

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae, the virus and their replication. **Fields virology**, p. 795-838, 2007.

SINGH, K.; CORNER, S.; CLARK, S.; SCHERBA, G. *et al.* Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. **J Vet Sci Technol**, 3, n. 6, p. 1-3, 2012.

VANNUCCI, F. A.; LINHARES, D.; BARCELLOS, D.; LAM, H. *et al.* Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, 62, n. 6, p. 589-593, 2015.

VENKATARAMAN, S.; REDDY, S. P.; LOO, J.; IDAMAKANTI, N. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of Seneca Valley virus-001, a new member of the Picornaviridae family. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, 64, n. 4, p. 293-296, 2008.

WEN, W.; CHEN, X.; LV, Q.; CHEN, H. *et al.* Identification of a conserved neutralizing epitope in Seneca Valley virus VP2 protein: new insight for epitope vaccine designment. **Virology Journal**, 19, n. 1, p. 1-10, 2022.

WU, Q.; ZHAO, X.; BAI, Y.; SUN, B. *et al.* The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 64, n. 5, p. 1633-1640, 2017.

WU, Q.; ZHAO, X.; CHEN, Y.; HE, X. *et al.* Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China. **Genome Announcements**, 4, n. 1, p. e01509-01515, 2016.

YANG, M.; VAN BRUGGEN, R.; XU, W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, 24, n. 1, p. 42-50, 2012.

YOON, K.-J.; ZIMMERMAN, J. J.; MORILLA, A. **Trends in emerging viral infections of swine**. John Wiley & Sons, 2008. 0470376600.