



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia



Desenvolvimento e padronização de PCR digital e metagenômica viral para avaliação do *Senecavirus A* em surtos de doenças vesiculares ocorridos em suínos no Brasil

Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Belo Horizonte

2019

043

Oliveira, Tatiana Flávia Pinheiro de.

Desenvolvimento e padronização de PCR digital e metagenômica viral para avaliação do *Senecavirus A* em surtos de doenças vesiculares ocorridos em suínos no Brasil [manuscrito] / Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira. - 2019.
156 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. Orientador: Aristóteles Góes Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Metagenômica. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Picornaviridae. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Góes Neto, Aristóteles. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE TATIANA FLÁVIA PINHEIRO DE OLIVEIRA
Nº REGISTRO: 2015747880

Às 14 horas do dia 25 de maio de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Betânia Paiva Drumond (UFMG), Maria Isabel Maldonado Guedes (UFMG), Roberto Maurício Carvalho Guedes (UFMG), Izinara Rosse da Cruz (UFOP), Edviges Maristela Pituco (Centro Panamericano de Febre Aftosa) e os(as) Profs(as). Edel Figueiredo Barbosa Stancioli – Orientador(a) e Aristóteles Góes Neto – Co-orientador para julgar o trabalho final Desenvolvimento e padronização de PCR Digital e metagenômica viral para avaliação do *Senecavirus A* em surtos de doenças vesiculares ocorridas no Brasil, da aluna Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Betânia Paiva Drumond – sub-coordenadora do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de Maio de 2019.

Prof(a). Dr(a). Betânia Paiva Drumond Betânia Paiva Drumond

Prof(a). Dr(a). Maria Isabel Maldonado Guedes Maria Isabel Maldonado Guedes

Prof(a). Dr(a). Roberto Maurício Carvalho Guedes Roberto Maurício Carvalho Guedes

Prof(a). Dr(a). Izinara Rosse da Cruz Izinara Rosse da Cruz

Prof(a). Dr(a). Edviges Maristela Pituco Edviges Maristela Pituco

Prof(a). Dr(a). Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Orientadora) Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Prof(a). Dr(a). Aristóteles Góes Neto (Co-orientador) Aristóteles Góes Neto

Betânia Paiva Drumond

Profa. Betânia Paiva Drumond
Sub-Coordenadora

Lista de abreviaturas e siglas

aa- aminoácidos

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

BVDV - *Bovine viral diarrhea virus* (Vírus da diarreia viral bovina)

cDNA - DNA complementar

CT- *cycle threshold*

dPCR – PCR digital

ddPCR – droplet digital PCR – PCR digital em gotas

EUA - Estados Unidos da América

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

HMMs - *hidden Markov models* – modelos ocultos de Markov

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IMA-MG – Instituto Mineiro de Agropecuária de Minas Gerais

LANAGRO-MG – Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais

LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais

LDL - lipoproteína de baixa densidade

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEM - Meio Essencial Mínimo

NB4 - nível de biossegurança 4

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NGS - *next-generation sequencing* - sequenciamento de última geração

NTC – *no template control* (controle negativo)

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame* - Fase aberta de leitura

PCR – Reação em cadeia da polimerase

p.i. – pós inoculação

PNEFA - Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa

PNSS - Programa Nacional de Sanidade Suídea

RNA– Ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

RT- *Reverse Transcriptase* -Transcrição Reversa

RT-ddPCR – *reverse transcriptase droplet digital PCR* – Transcrição reversa seguida de PCR digital em gotas

RT-PCR - Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida da PCR cinética ou PCR em tempo real

SPF - *Specific pathogen free* – livre de patógenos específicos

SS - *Single strand* - fita simples

VPg - proteína viral ligada ao genoma

SVA – *Senecavirus A*

SVV- *Seneca Valley Virus*

TCID₅₀/mL- *tissue culture infective dose 50/mL*- dose de vírus capaz de infectar 50 % das culturas de células inoculadas /mL

USDA - *United States Department of Agriculture*

UTR - *Untranslated region* - região não traduzida

Resumo

Em fevereiro de 2015, amostras biológicas de suínos provenientes de surtos de doenças vesiculares ocorridos em granjas de diferentes estados brasileiros foram enviadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O único agente encontrado nessas amostras foi o *Senecavirus A* (SVA). Este vírus pertence ao gênero *Senecavirus*, Ordem *Picornavirales*, Família *Picornaviridae* e Reino *Riboviria*. Essa família abriga também o gênero *Aphthovirus*, cuja espécie tipo é o *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), agente da Febre Aftosa, doença altamente infecciosa, de notificação compulsória, sob controle estrito do MAPA e recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). O SVA nunca havia sido relatado no Brasil, tendo sido reportado oficialmente pelo LFDA-MG e, primeiramente publicado por dois grupos brasileiros em julho de 2015. Destaca-se ainda o fato de que a doença induzida pelo SVA é incipiente no país e no mundo, o que pontua a necessidade de estudos básicos e aplicados sobre o SVA. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença do *Senecavirus A* e de outros vírus nestas amostras biológicas, e analisar a associação desses aos surtos de doenças vesiculares envolvendo granjas de suínos de diferentes estados brasileiros utilizando a abordagem metagenômica viral. Além das análises independentes de cultivo, o isolamento viral e caracterização destes isolados foi também realizada a fim de estabelecer a padronização de técnicas, como a soroneutralização viral, dentre outras, para a expansão do diagnóstico para o SVA nos laboratórios oficiais brasileiros. PCRs digitais para FMDV e SVA (RT-ddPCR) foram desenvolvidas e padronizadas avaliando parâmetros como sensibilidade e especificidade analítica e diagnóstica. Amostras de epitélio e soro pertencentes ao surto de enfermidade vesicular ocorrido em 2015 foram extraídas e submetidas a RT-ddPCR-SVA a fim de selecionar amostras para análise de metagenômica viral a partir dos dados de quantificação absoluta. O viroma foi realizado a partir da extração de ácidos nucleicos totais em seis amostras (epitélio e soro) com posterior eliminação de DNA. A plataforma HiSeq foi utilizada e a análise dos dados foi feita utilizando o *pipeline* MetLab com adição de parâmetros conjuntos de qualidade. O presente trabalho permitiu oferecer duas novas ferramentas (RT-ddPCR) sensíveis e específicas ao diagnóstico de FMDV e SVA, sendo a RT-ddPCR-SVA aplicada nas amostras submetidas ao viroma. Em relação ao viroma, foram classificadas inicialmente 19 famílias de RNA e 21 de DNA. Entretanto, após critérios conjuntos de avaliação (filtro por tamanho, *e-value*, identidade/similaridade, cobertura, avaliação da região do contig), esses números reduziram para uma família de RNA (*Picornaviridae*) e quatro (4) famílias de DNA (*Geminiviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae* e *Siphoviridae*). O *Senecavirus A* foi o único vírus de RNA confirmado e presente em cinco (5) de seis (6) amostras. Além desse vírus, foram classificados e confirmados fagos e um vírus de planta. O presente trabalho contribuiu para a validação da abordagem metagenômica e da PCR digital nos laboratórios de referência governamental para utilização, especialmente, em situações de surtos, mas, também na vigilância epidemiológica de agentes virais em espécies animais de importância no cenário nacional. Além disso, destaca a importância de controle de qualidade criterioso que deve levar em consideração vários parâmetros na confirmação das classificações virais a fim de evitar resultados falso positivos e especulações errôneas a partir de dados massivos.

Palavras-chave: viroma, *Senecavirus A*, PCR digital, sequenciamento paralelo massivo, parâmetros de qualidade.

Abstract

In February 2015, there was an outbreak of vesicular diseases on pig farms in different states of Brazil. As a result, swine biological samples were sent to one of the laboratories of Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), the Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG). The only infectious agent found in these samples was *Senecavirus A* (SVA). This virus is of *Senecavirus* genera belonging to *Picornavirales* Order, *Picornaviridae* family and *Riboviria* realm. The *Picornaviridae* family also includes the *Aphthovirus* genera, whose species type is *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), which causes the foot-and-mouth disease, a highly notifiable disease under the strict control of MAPA and recommended by the World Organization for Animal Health (OIE). The SVA had never been reported in Brazil, having been officially reported by the LFDA-MG and first published by two Brazilian groups in July 2015. Highlighting the fact that the disease caused by SVA is incipient in the country and the world at large, pointing to the need for basic and applied studies of SVA. The objective of this study was to check the presence of SVA and other viruses in these biological samples, and analyse their association with the vesicular disease outbreaks which occurred on the pig farms of different Brazilian states using the viral metagenomic approach. In addition to techniques requiring no cell culture, viral isolation and characterization of these isolates were also performed, aiming at the standardization of techniques such as viral seroneutralization, among others, for the improvement of SVA diagnosis in official Brazilian laboratories. Digital PCR for FMDV and SVA (RT-ddPCR) were developed and standardized, evaluating parameters such as analytical and diagnostic sensitivity and specificity. Swine samples (epithelium and serum) belonging to the outbreak of vesicular disease of 2015 were extracted and submitted to RT-ddPCR-SVA in order to be selected for viral metagenomics analysis (virome) from the absolute quantification data. Virome was performed from total nucleic acid in six samples (pool of epithelium or serum) with subsequent elimination of DNA. The HiSeq platform was used and data analysis was performed using the MetLab pipeline with the addition of quality parameters. The present work offered two new tools (RT-ddPCR) sensitive and specific for the diagnosis of FMDV and SVA, and the RT-ddPCR-SVA was applied in the samples submitted to virome. In relation to virome analysis, 19 families of RNA and 21 of DNA were initially classified. However, after joint evaluation using the following criteria: filter by size, e-value, identity / similarity, coverage, evaluation of the contig region, these numbers reduced to one family of RNA (*Picornaviridae*) and four (4) families of DNA (*Geminiviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae* and *Siphoviridae*). *Senecavirus A* was the only RNA virus confirmed and identified in five (5) of six (6) samples. In addition to this virus, phages and a plant virus were classified and confirmed. The present work contributed to the validation of the viral metagenomic approach and digital PCR in government reference laboratories for use, especially in outbreak situations, as well as in the epidemiological surveillance of viral agents in animal species of importance in the national scenario. In addition, it highlights the importance of the need for strict quality control, taking into account several parameters with regards to the confirmation of viral classifications in order to avoid false positive results and erroneous speculation from massive data.

Keywords: virome analysis, *Senecavirus A*, digital PCR, high-throughput, strict quality control.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a fonte divina de tudo que é, aos seres de luz que me protegem e me guiam e ao meu EU SUPERIOR por ser quem EU SOU. A minha família, meu laço inicial mais profundo, gratidão! Em especial ao meu pai pela resiliência e compaixão para com as pessoas e a minha mãe e minha avó Dindinha (*in memoriam* as duas), por terem sido um dos maiores exemplos maternos de coragem, fé e força na vida. Agradeço também aos meus irmãos, especial minha irmã, companheira de vida, uma grande amiga que a vida me deu. Às minhas tias Cidinha e Ção pela conexão materna existente atualmente. Além disso, a Juboka, Nay e Thiago, primos irmãos *forever*. Não podia esquecer das minhas gatinhas Tunica e Tinoca que permitem eu praticar diariamente um lado materno.

Aos meus amigos de vida por me acompanharem nessa jornada, trazerem alegria em torno de fases desafiadoras. Não mencionarei nomes aqui, mas vocês sabem quem são, são os que convivo presencialmente, estão no meu trabalho, os que adquiri em diferentes fases da minha vida, são os meus companheiros de saídas, de viagens, de momentos felizes e árduos também. Gratidão!

A minha orientadora Professora Doutora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, obrigada por todos auxílios e orientação. Se existe uma orientadora que literalmente orienta e te prepara para apresentações, arguições, escrita de artigos, etc, está aí uma indicação. Obrigada professora, por tantos aprendizados não somente profissionais como pessoais e por me aceitar como aluna nessa etapa tão transformadora em minha vida.

Ao meu orientador Professor Doutor Aristóteles Góes Neto, obrigada também por me aceitar como sua aluna e por tantos auxílios que surgiram no decorrer do doutorado, além da confiança e parceria em permitir que eu também pudesse colaborar em alguns de seus projetos.

Ao professor Doutor Marcos Augusto dos Santos por me apresentar uma área nova e desafiadora. Gratidão também pela amizade, por tantas conversas existenciais sobre música, arte e filosofia. As aulas se tornavam sempre uma terapia holística (rsrs) e obrigada pelos cafés científicos.

Aos integrantes titulares da banca examinadora, doutores Betania Paiva Drumond, Edviges Maristela Pituco, Izinara Rosse da Cruz, Maria Isabel Maldonado Guedes e Roberto Mauricio Carvalho Guedes que contribuíram na etapa final com sugestões enriquecedoras ao

trabalho. Agradeço também aos integrantes suplentes doutores Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva e Marcelo Fernandes Camargos pela disponibilidade e correção.

Agradeço ao Instituto Mineiro de Agropecuária, ao qual faço parte e ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), recentemente denominado como LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, onde executo as atividades. Agradecimento especial aos doutores Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota, Anapolino Macedo de Oliveira, Nilson César Castanheira Guimarães e Andréa Melo Garcia de Oliveira por todo apoio nesses quase 13 anos de minha vida profissional no laboratório. O LFDA-MG é mesmo um local insólito, de elevada infraestrutura, que permite grandes aprendizados e ainda bons convívios.

Agradeço ao doutor Marcelo Fernandes Camargos, meu chefe ou melhor líder, um grande exemplo de profissional e quem o conhece o admira ainda mais como pessoa, um ser de uma das almas mais humanas e belas que já conheci. Você é um exemplo para mim, Marcelão. Aos amigos Marconito, Jaque, Isabelinha, Aládio, Anselmo, Aline e Valdênia, do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV), do qual faço parte, pelas alegrias diárias e amizade. Agradecimento especial ao Anapolino, que foi uma pessoa muito importante para realização do doutorado e um companheiro de vida durante muito tempo.

Ao doutor Antônio Fonseca Júnior (Junicoca) por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) mais uma vez para mim e por permitir um contato mais íntimo com a ciência em métodos novos. Além disso, agradeço pelo retorno de nossa amizade, nossas conversas no café sempre me fizeram refletir sobre ciência, vida e autoconhecimento. Os meus agradecimentos também a todos os integrantes do LBM.

Ao Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA) por sempre me receberem tão bem, sempre com um abraço querido. Além disso, por auxiliarem muito nos seminários que apresentei sobre os temas do doutorado. Destaco a Silvinha por me auxiliar em muitas etapas do viroma como preparação das amostras para envio, PCR, análises de bioinformática e pela amizade.

Ao meu grande amigo my friendiii Dener que também ganhei no doutorado, que foi uma das pessoas mais importantes no projeto viroma. Gratidão eterna por todos auxílios mesmo em momentos em que não podia e ele estava lá me ajudando. Foram altas horas de análises, scripts realizados por ele, conversas diárias no WhatsApp não somente sobre ciência, mas sobre situações corriqueiras da vida. Obrigada também pelas aventuras de bike junto com a Polly, minha amiga de mais de 25 anos e afilhada de crisma, momentos esses de

descontração quando as análises de bioinfo não estavam indo lá tão bem. Agradeço ao Eric também por auxiliar nas análises de bioinformática.

Aos muitos laboratórios que adentrei, rsrs. Aos amigos do Centro Panamericano de Febre Aftosa, pelo convívio diário na salinha da Biossegurança durante a minha fase de escrita e análise de dados, sempre na torcida para chegada do Grande Dia. Especial agradecimento a minha afilhada Joaozinha (Suh) pela grande amizade e apoio nas dificuldades e a Arianna pela amizade e por tantos auxílios holísticos que permitiram intensificar minha autoconexão.

A todos os integrantes da Unidade de Biossegurança do LANAGRO-MG, todos sem exceção, pelo maravilhoso convívio diário, em especial a Kelly Fagundes por me aceitar em um local que rendeu tantas escritas e análises de bioinformática e ainda pelos prazerosos cafés com bolo de figo que é um dos meus doces favoritos. Ahhhh a Gilsara, Érica e Sheila também, muita gratidão pelos mimos diários, que delícia ser tratada assim!

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF) por me permitir auxiliar em alguns dos seus projetos e ainda por me receberem tão bem, em especial a Paula e Marcelo que sempre me atendiam com prontidão e tiravam um tempinho para conversarmos. Esses momentos de conversas, embora não estão diretamente ligados ao doutorado, sempre fizeram a diferença e trouxeram leveza a essa etapa quando estava na UFMG.

Ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA), o qual considero um laboratório tão mágico, com pessoas maravilhosas como Silvinha, Naty, Anna Gabriela e Tata, as “fedidinhas” que ganhei nessa etapa, por meio da minha grande amiga fedidinha mor Anna Gabriela. Gratidão pelos momentos de descontração, almoços e conversas dentro e fora da UFMG.

Aos amigos Marconi, Mariana, Michele, Ivy e Suzana que sempre me cediam suas casinhas em Pedro Leopoldo quando ficava até tarde no trabalho fazendo análises do doutorado ou no caso de me receber para muitos almoços entre os percursos trabalho-UFMG como a feiosa Aline Alexandrina. Gratidão pelas maravilhosas recepções.

A minha grande amiga, dona Ioninha, exemplo de senhora forte, de quase 90 anos, lúcida, sensível, artista que me ensina a pintar e que trouxe leveza e arte a minha vida acadêmica também. Aos amigos da LABanda-Nozes que foram sensacionais nessa etapa da minha vida, permitindo que a música entrasse por todo meu ser e me trouxesse alegria, força e também leveza para executar o doutorado. Especial agradecimento a Isabelinha, minha grande

amiga, quem consolidou o projeto e ainda batalha pela sua permanência. Gratidão também aos meus mestres musicais Edith, Abílio e Célio por permitirem esse meu aprofundamento com a música e com isso auxiliando para que meu corpo e mente estejam bem e vitais para a finalização do doutorado.

Por último, gratidão por essa etapa modificadora do meu ser, a qual me transformei muito. Foram tantos acontecimentos em quase três anos e meio, como perdas profundas de pessoas queridas como minha grande amiga Livinha, minhas avós e um tratamento no meu pulmão. Mas por outro lado, outros tantos ganhos, muitos amigos brasileiros e de diferentes nacionalidades que levarei até o fim de minha passagem aqui na Terra, conhecimentos adquiridos em diferentes áreas e auxílios de tantas pessoas.

Um ciclo se fechou com muito amor e aprendizado. Doutora virei, mas espero ser doutora da vida um dia também e que eu viva muiiiito. Do fundo do meu coração, escrevo esse texto em uma das seções mais importante da tese e com a sensação sincera e feliz de que sou mesmo uma pessoa de sorte por ter convivido e ainda conviver com pessoas maravilhosas. Namastê!

“ ... mire, veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam, verdade maior...”

Guimarães Rosa

Sumário

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 A SUINOCULTURA E SEUS ÍNDICES ECONÔMICOS	18
1.2 ENFERMIDADES VESICULARES EM SUÍNOS	21
1.3 CARACTERÍSTICAS DA ORDEM PICORNAVIRALES, FAMÍLIA PICORNAVIRIDAE	23
1.3.1 <i>Característica da multiplicação dos picornavírus (Racaniello, 2013)</i>	25
1.4 SENECAVIRUS A	28
1.5 SURTOS EM GRANJAS NO BRASIL - AMOSTRAS ENVIADAS PARA SERVIÇO OFICIAL DE SUSPEITA DE ENFERMIDADES VESICULARES	34
1.6 PCR DIGITAL	37
1.7 METAGENÔMICA VIRAL.....	40
2 JUSTIFICATIVA	48
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 AMOSTRAS	53
4.2 ISOLAMENTO VIRAL	54
4.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	55
4.3.1 <i>Extração de RNA</i>	55
4.3.2 <i>Extração de DNA</i>	55
4.3.3 <i>Extração de ácido nucleico total</i>	55
4.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	55
4.5 PADRONIZAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA PCR DIGITAL EM GOTAS (RT-DDPCR)	56
4.5.1 <i>Oligonucleotídeos</i>	56
4.5.2 <i>Determinando a temperatura ótima de anelamento / extensão</i>	57
4.5.3 <i>Condições de amplificação</i>	57
4.5.4 <i>Sensibilidade analítica</i>	59
4.5.5 <i>Especificidade analítica</i>	59
4.5.6 <i>Especificidade diagnóstica</i>	60
4.6 USO DA RT-DDPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SVA.....	60
4.7 AMOSTRAS SELECIONADAS PARA METAGENÔMICA VIRAL.....	60
4.8 METAGENÔMICA VIRAL.....	61
4.8.1 <i>Construção e sequenciamento das bibliotecas</i>	61
4.8.2 <i>Análise dos dados obtidos</i>	61
4.9 INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS.....	63
5 RESULTADOS	65
5.1 ISOLAMENTO VIRAL	65
5.2 PADRONIZAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA PCR DIGITAL EM GOTAS (RT-DDPCR)	66
5.2.1 <i>Oligonucleotídeos</i>	66
5.2.2 <i>Determinando a temperatura ótima de anelamento / extensão</i>	67
5.2.3 <i>Sensibilidade analítica</i>	67
5.2.4 <i>Especificidade analítica</i>	70
5.2.5 <i>Especificidade diagnóstica</i>	70
5.3 USO DA RT-DDPCR PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SVA NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DOS SURTOS DE DOENÇAS VESICULARES	73
5.4 AMOSTRAS SELECIONADAS PARA METAGENÔMICA VIRAL.....	75
5.5 METAGENÔMICA VIRAL.....	77
5.6 INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS.....	113
5.6.5 <i>Reconstrução de árvores</i>	114
6 DISCUSSÃO	118

7 CONCLUSÕES	132
8 PERSPECTIVAS.....	134
9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CURSOS	136
10 REFERÊNCIAS	140

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos agentes etiológicos das principais doenças vesiculares em suínos	21
Tabela 2 – Classificação da Família Picornaviridae.....	23
Tabela 3 - Amostras de epitélio, soro e líquido vesicular, provenientes dos surtos de doenças vesiculares ocorridos no Brasil, no ano de 2015.	53
Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados no estudo, sequência, região e referência.....	56
Tabela 5 – Condições de amplificação das técnicas moleculares utilizadas neste estudo.....	57
Tabela 6 - Vírus de RNA e DNA utilizados na especificidade analítica das RT-ddPCR	59
Tabela 7 – Resultados da sensibilidade analítica das técnicas RT-ddPCR e RT-qPCR na detecção dos vírus FMDV e SVA	67
Tabela 8 - Número de cópias de RNA detectadas em cada amostra positiva do último surto de Febre Aftosa no Brasil.....	73
Tabela 9 – Quantidade de amostras detectadas e não detectadas na RT-ddPCR e RT-qPCR.	74
Tabela 10 – Resultados da quantificação absoluta de SVA pela RT-ddPCR e valores de CT das RT-qPCR para SVA e beta-actina nas amostras positivas.....	74
Tabela 11 - Descrição dos pools de epitélio ou soro avaliados por metagenômica viral	76
Tabela 12 - Resultados de quantificação das amostras submetidas ao viroma pela PCR digital para o SVA	76
Tabela 13 - Tamanho dos arquivos do sequenciamento paralelo massivo nas amostras do surto	77
Tabela 14 - Número de <i>reads</i> totais e após avaliação do PRINSEQ (número de <i>reads</i> de boa qualidade) e Bowtie (número de <i>reads</i> do hospedeiro e utilizados para montagem).....	85
Tabela 15 - Número de sequências de baixa qualidade obtido pelo log de dados do PRINSEQ presente no MetLab	85
Tabela 16 - Dados obtidos na etapa de montagem (número total de sequências) e na etapa de classificação.....	86
Tabela 17 - Dados obtidos na etapa de montagem (número total de sequências) e na etapa de classificação após filtro de 150 pb, adicionado no <i>pipeline</i>	87
Tabela 18 - Famílias classificadas de vírus de RNA e DNA com e sem filtro de 150 pb.....	91
Tabela 19 - Agentes virais classificados pertencentes à família <i>Picornaviridae</i>	92
Tabela 20 - Outros gêneros relacionados com agentes causadores de enfermidades vesiculares	93
Tabela 21 - Demais vírus de RNA classificados por amostra após filtro de 150 pb	94
Tabela 22 - Demais vírus de DNA classificados por amostra após filtro de 150 pb.....	98
Tabela 23 - Família e gêneros de vírus identificados pelo FragGeneScan por amostra após filtro de 150 pb	104
Tabela 24 - Contigs encontrados por amostra (total e do SVA).....	109
Tabela 25 - Número de contigs encontrados por amostra (total e do SVA).....	110

Lista de Figuras

Figura 1 – Maiores produtores de carne suína no mundo (mil toneladas) por ano	18
Figura 2 – Maiores produtores de carne suína no Brasil (mil toneladas) por ano.....	19
Figura 3 – Principais destinos da exportação de carne suína brasileira no 2º trimestre de 2018	20
Figura 4 - Diagrama do ciclo de multiplicação dos picornavírus	27
Figura 5 - Organização do genoma do Senecavirus A	29
Figura 6 - Lesões vesiculares em focinho (A e C) e hiperemia da coroa do casco de fêmeas reprodutoras (B) de granja do município de Uberlândia (MG).....	35
Figura 7 - Mapeamento da coleta de amostras biológicas de suínos provenientes dos surtos de doenças vesiculares. Balões vermelhos indicam as cidades de amostragem (53 municípios) .	36
Figura 8 – Comparação das técnicas de PCR.....	38
Figura 9 - Esquema simplificado da reação de PCR digital em gotas.....	39
Figura 10 – Componentes de um viroma	42
Figura 11 - Processo de sequenciamento do Illumina MiSeq/HiSeq	44
Figura 12 - Esquema simplificado de funcionamento do programa MetLab.....	62
Figura 13 - Isolamento do SVA em aumento de 40x	65
Figura 14 - Isolamento do SVA em aumento de 100x	66
Figura 15 – RT-ddPCR <i>one-step</i> para SVA utilizando sonda com único quencher (A) e com duplo quencher (B)	67
Figura 16 – Limite de detecção das técnicas moleculares para detecção do FMDV	68
Figura 17 - Limite de detecção das RT-ddPCR <i>one-step</i> e <i>two-step</i> para detecção do SVA..	69
Figura 18 – RT-ddPCR <i>one step</i> para SVA em amostras de suíno negativas (ensaio de especificidade analítica)	71
Figura 19 - RT-ddPCR para FMDV nas amostras positivas do último surto ocorrido no Brasil, em 2005, no Mato Grosso do Sul.....	72
Figura 20 – Número de cópias/ μ L de cada amostra positiva testada (cDNA) pela RT-ddPCR para FMDV do último surto ocorrido no Mato Grosso do Sul.....	72
Figura 21 - PCR digital do SVA: Número de eventos (gotas positivas, negativas e totais) para cada amostra positiva.....	73
Figura 22 – Número e comprimento das sequências das <i>reads forward</i> e <i>reverse</i> das amostras 01 a 03 obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.....	78
Figura 23 – Número e comprimento das sequências das <i>reads forward</i> e <i>reverse</i> das amostras 04 a 06 obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.....	79
Figura 24 – Qualidade das sequências das <i>reads forward</i> e <i>reverse</i> das amostras 1 a 3 em Phred score de 0 a 40, obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.	80
Figura 25 – Qualidade das sequências das <i>reads forward</i> e <i>reverse</i> das amostras 4 a 6 em Phred score de 0 a 40, obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.	81
Figura 26 - Gráfico de conteúdo de GC das <i>reads forward</i> f (A) e <i>reverse</i> r (B) da amostra 03 pelo PRINSEQ.....	82
Figura 27 – Gráfico de componente principal (PCA) pelo PRINSEQ da amostra 03 (input 0- círculo vermelho) em relação à metagenomas microbianos de amostras de humanos, rato, litoral marinho, oceano aberto, estuário e peixe (intestino e muco) (círculos na cor roxa).	83
Figura 28 - Gráfico de componente principal (PCA) pelo PRINSEQ da amostra 03 (input 0- círculo vermelho) em relação a metagenomas virais de fezes, secreções nasais, e escarro humano, água doce (nascente, lago Antártico, recuperada/reciclada), tecido cerebral de rato, intestino de peixe e mosquito (círculos na cor roxa).	84

Figura 29 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Minas Gerais e Goiás pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B).	88
Figura 30 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Santa Catarina e Rio Grande do Sul pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B).	89
Figura 31 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Santa Catarina e Rio Grande do Sul pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B).	90
Figura 32 – Contigs do <i>Senecavirus A</i> encontrados por amostra em relação à referência NC_011349.1 do SVA de forma circular (1) pelo Circos da plataforma Galaxy e linear (2) pelo programa R	112
Figura 33 – Análise do sinal filogenético da amostra 03 (epitélio SC) frente a 117 sequências do genoma completo do <i>Senecavirus A</i> utilizando o software Tree-Puzzle 5.3.	113
Figura 34 – Análise de saturação pelo software DAMBE a partir da sequência alinhada do maior contig da amostra 03 (epitélio SC) com 117 sequências do genoma completo do SV-A	114
Figura 35 – Árvore reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (MEGA 7.026) com 1000 réplicas de Bootstrap utilizando o modelo Tamura-Nei com distribuição Gamma e regiões invariáveis (TN93+G+I) a partir de sequências do genoma completo do SVA	115
Figura 36 – Árvore reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (MEGA 7.0.26) com 1000 réplicas de Bootstrap a partir de sequências do genoma completo do SVA. A seta vermelha apresenta a amostra 03, de epitélio de SC da presente tese	116

*Revisão
Bibliográfica*

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A Suinocultura e seus índices econômicos

A carne suína é a fonte de produção animal mais consumida mundialmente, atingindo o índice de consumo de 36 % dentre as proteínas animais. A ela segue-se a carne de frango e a bovina, com 35 % e 22 %, respectivamente (FAO, 2019).

A produção mundial desse tipo de carne cresceu numa taxa anual de 1,6 % nos últimos dez (10) anos, apesar de parte considerável da população mundial não a consumir por motivos religiosos (Guimarães et al., 2017). Os 10 maiores produtores mundiais estão na seguinte ordem crescente: China, União Européia, Estados Unidos, Brasil, Rússia, Vietnã, Canadá, Filipinas, Japão e Coreia do Sul (Embrapa, 2017) (Figura 1). No ano de 2018, foram produzidas 113.500 milhões de toneladas de carne suína no mundo (USDA, 2018).

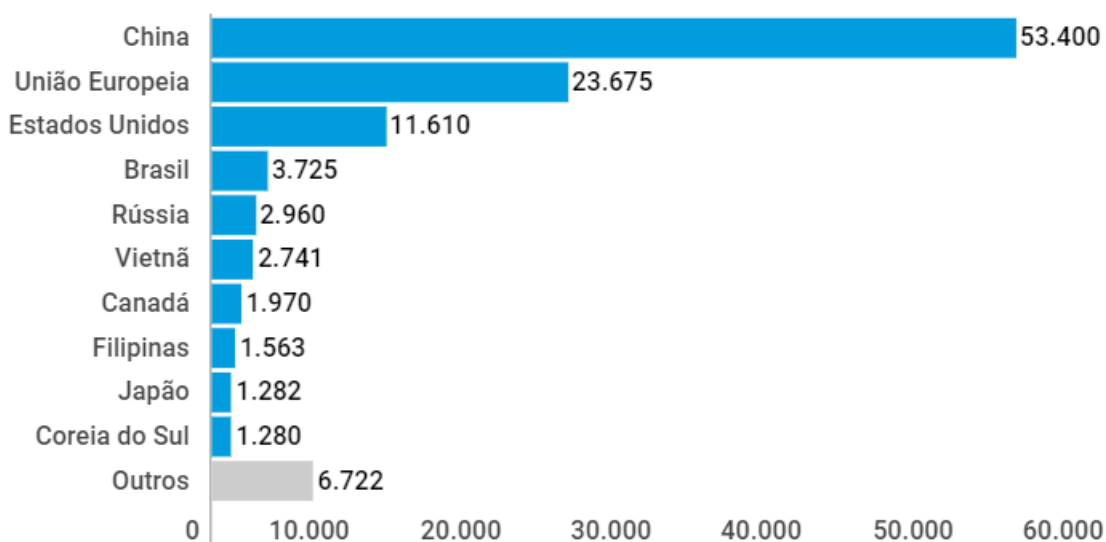


Figura 1 – Maiores produtores de carne suína no mundo (mil toneladas) por ano. Fonte: EMBRAPA (2017).

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, também cresceu significativamente nas últimas décadas. Segundo estimativas, a produção de carne suína no Brasil está próxima a 3,75 milhões toneladas (ABPA, 2018). Atualmente, no Brasil, a suinocultura possui dois tipos de produção, em sua maioria, de forma integrada à indústria ou de forma independente, cujos criadores se responsabilizam por todo processo de produção, o que implica na fixação do homem no campo e, por conseguinte, na geração de empregos (BNDES, 2017).

A produção de suínos é forte no sul do país, mas os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo e Goiás também são importantes produtores (EMBRAPA, 2017) (figura 2).

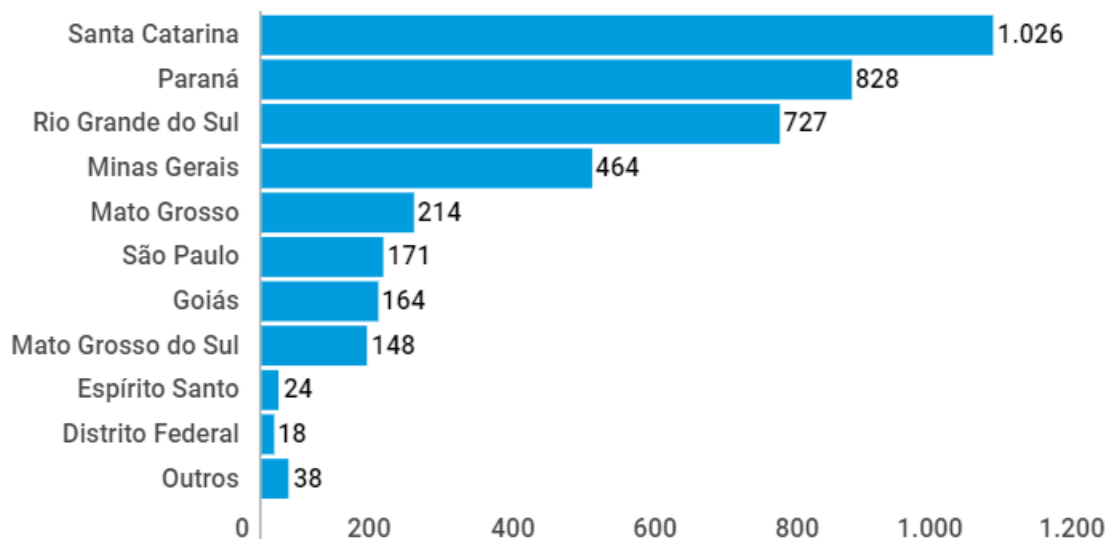


Figura 2 – Maiores produtores de carne suína no Brasil (mil toneladas) por ano. Fonte: EMBRAPA (2017).

Os efetivos de suínos no país somam 41.100.000 cabeças. Os estados onde concentram o maior número de suínos são Santa Catarina (19,7 %), Paraná (16,8 %) e Rio Grande do Sul (14,6 %). Do efetivo total de suínos, 11,5 % correspondem a matrizes, sendo que os municípios que detêm os maiores efetivos de matrizes de suínos são Toledo (PR), Rio Verde (GO) e Uberlândia (MG) (IBGE, 2017).

No que se refere ao destino da produção brasileira da carne suína, dados da Associação Brasileira de Proteína Animal indicam que 18,5 % da carne são destinadas à exportação e 81,5 %, ao mercado interno (ABPA, 2018). As exportações brasileiras de carne de suíno tiveram a China como o seu principal destino no 2º trimestre de 2018. Também figuram na lista dos principais destinos da exportação de carne suína por *ranking* de participação, Hong Kong, Uruguai, Argentina, Cingapura, Chile e Angola (IBGE, 2018) (Figura 3).

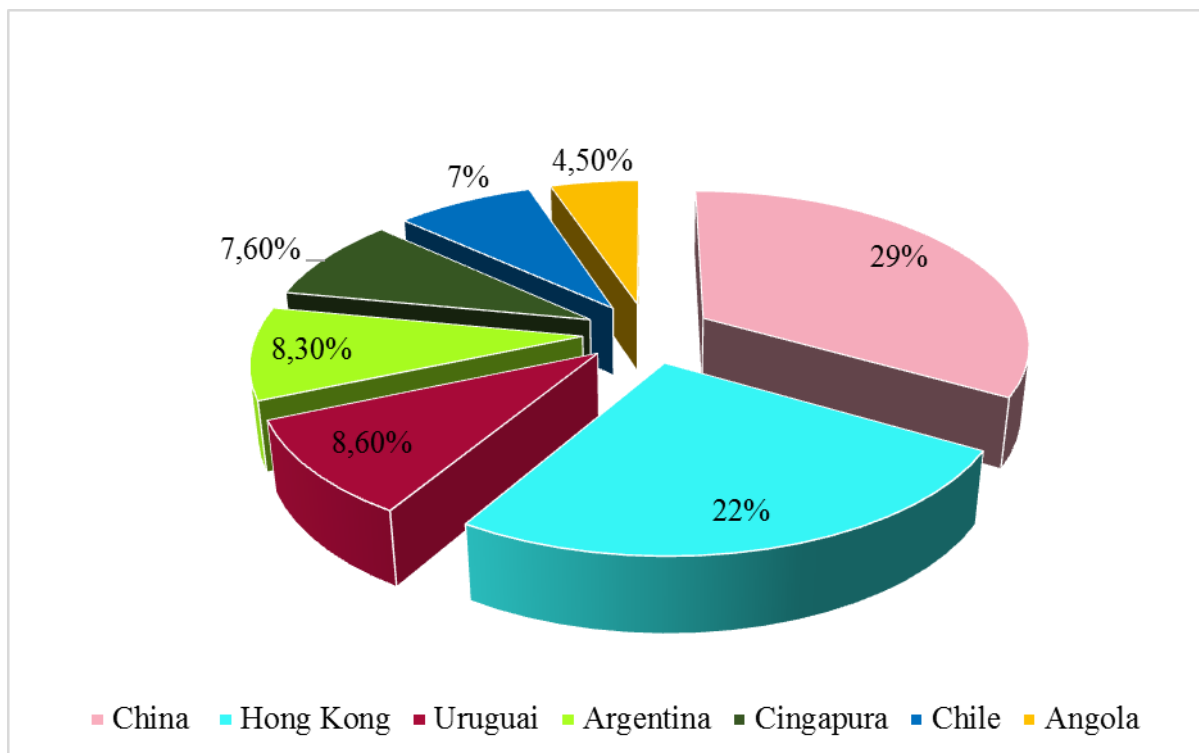


Figura 3 – Principais destinos da exportação de carne suína brasileira no 2º trimestre de 2018. Fonte: IBGE (2018).

O aumento da oferta interna de carne suína e o fato de o Brasil estar em destaque no cenário mundial podem ser atribuídos a fatores como sanidade, nutrição, manejo da granja, produção integrada e aprimoramento gerencial dos produtores (Fisher, 2013). Dentre esses fatores, a saúde animal é uma das principais barreiras não tarifárias para embargo das exportações da carne suína (Sobestiansky, 2002).

O Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituído pela Instrução Normativa nº 47, de 18 de junho de 2004, redigiu o Regulamento Técnico que trata do controle sanitário oficial a ser realizado nos estabelecimentos de criação de suídeos. As atividades do PNSS têm como objetivo a coordenação, normatização e o suporte das ações de defesa sanitária animal referentes à suinocultura nacional, visando preservar a sanidade do rebanho suídeo brasileiro (Brasil, 2004).

O programa possui atenção especial ao controle e erradicação da Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky e outras doenças listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (Brasil, 2004). Além disso, a vigilância sanitária de enfermidades como doenças

vesiculares dos suínos é contemplada em programas como o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA) (Brasil, 2007).

1.2 Enfermidades Vesiculares em Suínos

Segundo o PNEFA, as enfermidades vesiculares ou doenças vesiculares infecciosas são consideradas um conjunto de doenças transmissíveis caracterizadas, principalmente, por febre e pela síndrome de claudicação e sialorréia. Esses sintomas são decorrentes de vesículas ou lesões vesiculares nas regiões da boca, focinho ou patas, podendo também ser encontradas na região do úbere (Brasil, 2007).

As principais enfermidades vesiculares em suínos são a Febre Aftosa, Estomatite Vesicular, Doença Vesicular dos Suínos e Exantema Vesicular dos Suínos (Lubroth et al., 2013). Elas apresentam em comum, a origem viral, além de possuírem sintomas clínicos indistinguíveis (House; House, 1999; Brasil, 2007; OIE, 2012) (tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos agentes etiológicos das principais doenças vesiculares em suínos

Agente	Classificação	Ácido Nucléico	Tamanho e estabilidade	Sorotipos
Vírus da Febre Aftosa (<i>Foot-and-mouth disease virus</i> - FMDV)	<i>Picornavirales</i> <i>Picornaviridae</i> <i>Aphthovirus</i>	SS* RNA (senso positivo)	22-30 nm; instável em pH abaixo de 7,0; resistente ao éter	Sete (7) sorotipos mostram graus variados de proteção cruzada
Vírus da Doença Vesicular dos suínos (<i>Swine vesicular disease virus</i> - SVDV)	<i>Picornavirales</i> <i>Picornaviridae</i> <i>Enterovirus</i>	SS RNA (senso positivo)	22-30 nm; estável em meio ácido; resistente ao éter	Somente um (1) sorotipo, relacionado antigenicamente ao <i>Coxsackie B5 virus</i>
Vírus do Exantema Vesicular dos suínos (<i>Vesicular exanthema of swine virus</i> - VESV)	<i>Unassigned</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Vesivirus</i>	SS RNA (senso positivo)	35-39 nm; instável em pH abaixo de 3; resistente ao éter	26 ou mais sorotipos
Vírus da Estomatite Vesicular (<i>Vesicular stomatitis indiana virus</i> - VSIV)	<i>Mononegavirales</i> <i>Rhabdoviridae</i> <i>Vesiculovirus</i>	SS RNA (senso negativo)	70 x 170 nm; estável em pH de 5-10; instável em éter	Duas espécies virais de importância para os suínos: <i>New Jersey</i> e <i>Indiana 1</i>

*SS: *Single Strand* – Fita simples

Fonte: Adaptado de House e House (1999).

Além desses, outros agentes que causam lesões vesiculares devem ser considerados: *Swinepox virus* (*Poxviridae*, *Chordopoxvirinae*, *Suipoxvirus*), *Ungulate protoparvovirus 1*

(*Parvoviridae, Parvovirinae, Protoparvovirus*) e e Enterovirus G (*Riboviria, Picornavirales, Picornaviridae, Enterovirus*) (Knowles, 1988; Lubroth et al., 2013; ICTV, 2019).

Das enfermidades mostradas na tabela 1, a Doença Vesicular dos Suínos nunca foi reportada no Brasil (OIE, 2017). Além disso, a enfermidade Exantema Vesicular dos Suínos somente ocorreu nos Estados Unidos e na Islândia, mas foi considerada erradicada em 1959 e desde então não foram registrados mais casos em qualquer outra parte do mundo (Smith; Akers, 1976; Brasil, 2009). As demais já foram relatadas no país, sendo que, em 2014, houve focos confirmados de Estomatite Vesicular na Bahia, Piauí, Maranhão e Mato Grosso (MAPA, 2014; Cargnelutti et al., 2014), um caso em Natividade, Tocantins, no ano de 2016, e em 2017, um caso em Santa Maria da Vitória, na Bahia (de Oliveira et al., 2018).

Segundo a Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013, do MAPA, as doenças vesiculares estão entre as enfermidades que requerem notificação imediata de qualquer caso suspeito (Brasil, 2013). De uma forma geral, elas são tratadas como suspeita de Febre Aftosa até que os testes de laboratório confirmem outra causa. Isso devido a sua natureza altamente contagiosa e às dramáticas consequências econômicas que ela proporciona (Knight-Jones; Rushton, 2013).

O Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA) tem como objetivos a erradicação da Febre Aftosa em todo o Território Nacional e a sustentação dessa condição sanitária por meio da implantação de um sistema de vigilância sanitária apoiado na manutenção das estruturas do serviço veterinário oficial e na participação da comunidade. Os animais susceptíveis à doença são os bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, suínos, ruminantes silvestres, dentre outros (Brasil, 2007). Estima-se que um suíno pode transmitir por via aérea até 60 vezes mais vírus do que bovinos e ovinos (Alexandersen et al., 2003).

Em geral, os suínos domésticos (*Sus scrofa*) não são portadores do FMDV (Weaver et al., 2013). No entanto, Mohamed e colaboradores (2011) isolaram o vírus de suínos selvagens 33-35 dias após inoculação, o que indica que esses animais podem transmitir o FMDV para outros suínos selvagens ou domésticos. Outro fator considerado relevante no que tange às enfermidades vesiculares são as doenças vesiculares idiopáticas. Casos de erosões não debilitantes e vesículas no focinho, cavidade oral, pele e região coronária têm sido descritos em suínos ao longo dos anos sem uma causa identificável. Nesse sentido, esses casos foram definidos como Doença Vesicular Idiopática de Suínos (Cameron, 2006).

As lesões patológicas e histológicas das doenças vesiculares idiopáticas se assemelham às das principais doenças vesiculares dos animais, as quais são clínica e economicamente importantes. Casos dessas síndromes idiopáticas já foram relatados na Nova Zelândia, Austrália, Canadá, Flórida, Iowa e Indiana (Munday; Ryan, 1982; Amass et al., 2005; Pasma et al., 2008).

1.3 Características da Ordem *Picornavirales*, Família *Picornaviridae*

Parte dos agentes causadores de enfermidades vesiculares em suínos pertence à Ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae*. Além dessa família, a Ordem *Picornavirales* possui outras 5 famílias (*Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Polycipiviridae* e *Secoviridae*) (ICTV, 2019).

A família *Picornaviridae* possui 47 gêneros (Tabela 2). O nome dessa família foi concebido principalmente em relação à pequena dimensão dos vírus (Pico, unidade de medida da ordem de 10^{-12}). Em geral, os picornavírus possuem vírions esféricos, com diâmetro em torno de 30 nm. As partículas consistem de um capsídeo contendo quatro proteínas estruturais envolvendo um genoma de RNA. Além disso, as partículas não possuem um envelope lipídico, sendo então resistentes à ação de solventes orgânicos fracos (Racaniello, 2013).

Tabela 2 – Classificação da Família *Picornaviridae*

Gênero	Espécies
<i>Aalivirus</i>	<i>Aalivirus A</i>
<i>Ailurivirus</i>	<i>Ailurivirus A</i>
<i>Ampivirus</i>	<i>Ampivirus A</i>
<i>Anativirus</i>	<i>Anativirus A</i>
<i>Aphthovirus</i>	<i>Bovine rhinitis A virus, Bovine rhinitis B virus, Equine rhinitis A virus, Foot-and-mouth disease virus</i>
<i>Aquamavirus</i>	<i>Aquamavirus A</i>
<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avihepatovirus A</i>
<i>Avisivirus</i>	<i>Avisivirus A, Avisivirus B e Avisivirus C</i>
<i>Bopivirus</i>	<i>Bopivirus A</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Cardiovirus A, Cardiovirus B e Cardiovirus C</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Cosavirus A, Cosavirus B, Cosavirus D, Cosavirus E e Cosavirus F</i>

<i>Crohivirus</i>	<i>Crohivirus A e Crohivirus B</i>
<i>Dicipivirus</i>	<i>Cadicivirus A e Cadicivirus B</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A, Enterovirus B, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus E, Enterovirus F, Enterovirus G, Enterovirus H, Enterovirus I, Enterovirus J, Enterovirus k, Enterovirus L, Rhinovirus A, Rhinovirus B e Rhinovirus C.</i>
<i>Erbovirus</i>	<i>Erbovirus A</i>
<i>Gallivirus</i>	<i>Gallivirus A</i>
<i>Harkavirus</i>	<i>Harkavirus A</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatovirus A, Hepatovirus B, Hepatovirus C, Hepatovirus D, Hepatovirus E, Hepatovirus F, Hepatovirus G, Hepatovirus H e Hepatovirus I</i>
<i>Hunnivirus</i>	<i>Hunnivirus A</i>
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus A, Aichivirus B, Aichivirus C, Aichivirus D, Aichivirus E e Aichivirus F</i>
<i>Kunsagivirus</i>	<i>Kunsagivirus A, Kunsagivirus B e Kunsagivirus C</i>
<i>Limnipivirus</i>	<i>Limnipivirus A, Limnipivirus B e Limnipivirus C</i>
<i>Livupivirus</i>	<i>Livupivirus A</i>
<i>Malagasivirus</i>	<i>Malagasivirus A e Malagasivirus B</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Megrivirus A, Megrivirus B, Megrivirus C, Megrivirus D e Megrivirus E</i>
<i>Mischivirus</i>	<i>Mischivirus A, Mischivirus B, Mischivirus C e Mischivirus D</i>
<i>Mosavirus</i>	<i>Mosavirus A</i>
<i>Orivirus</i>	<i>Orivirus A</i>
<i>Oscivirus</i>	<i>Oscivirus A</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus A, Parechovirus B, Parechovirus C e Parechovirus D</i>
<i>Pasivirus</i>	<i>Pasivirus A</i>
<i>Passerivirus</i>	<i>Passerivirus A e Passerivirus B</i>
<i>Poecivirus</i>	<i>Poecivirus A</i>
<i>Potamipivirus</i>	<i>Potamipivirus A</i>
<i>Rabovirus</i>	<i>Rabovirus A, Rabovirus B, Rabovirus C e Rabovirus D</i>
<i>Rafivirus</i>	<i>Rafivirus A e Rafivirus B</i>
<i>Rosavirus</i>	<i>Rosavirus A, Rosavirus B e Rosavirus C</i>

<i>Sakobuvirus</i>	<i>Sakobuvirus A</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Salivirus A</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Sapelovirus A e Sapelovirus B</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>
<i>Shanbavirus</i>	<i>Shanbavirus A</i>
<i>Sicinivirus</i>	<i>Sicinivirus A</i>
<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus A</i>
<i>Torchivirus</i>	<i>Torchivirus A</i>
<i>Tottorivirus</i>	<i>Tottorivirus A</i>
<i>Tremovirus</i>	<i>Tremovirus A</i>

Fonte: Adaptado de ICTV (2019).

Destaque em negrito para o *Senecavirus A*, objeto maior de estudo do presente trabalho.

1.3.1 Característica da multiplicação dos picornavírus (Racaniello, 2013)

A multiplicação dos picornavírus ocorre no citoplasma celular. A primeira etapa é a de adsorção e penetração, onde ocorre a ligação do vírus a um receptor da célula. Entre os membros dos picornavírus, as quatro proteínas do capsídeo são arranjadas de forma semelhante, mas a arquitetura da superfície varia. Essas diferenças são importantes para os variados modos de interação com receptores celulares.

Diferentes tipos de moléculas de superfície celular servem como receptores para os picornavírus. Muitos picornavírus ligam-se às integrinas, as quais são receptores celulares de adesão diméricos contendo subunidades α e β . Grande parte dos receptores de integrina reconhecem o tripeptídeo ArgGlyAsp (RGD), cuja presença deste no capsídeo viral sugere a sua interação com o receptor. Para o *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), por exemplo, diferentes integrinas ($\alpha_v \beta_1$, $\alpha_v \beta_3$, $\alpha_v \beta_6$, $\alpha_v \beta_8$) já foram descritas como receptores de entrada do vírus na célula.

Uma vez que os picornavírus se ligam ao seu receptor celular, o capsídeo viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira pela via endocítica, seguido da liberação do genoma no citoplasma em seu local da multiplicação. Os picornavírus utilizam a endocitose mediada por clatrina ou por calveolina e, de maneira interessante, em experimentos utilizando células Hela foi ainda descrito uma outra via endocítica independente de clatrina ou calveolina. O desnudamento viral, com a consequente liberação do genoma ocorre com a acidificação do pH ou ainda pela atividade de um co-receptor.

Uma vez que o RNA de polaridade positiva é liberado no citoplasma, a VPg (proteína viral ligada ao genoma) é removida e este é imediatamente traduzido a fim de fornecer proteínas essenciais para a replicação do genoma, além de auxiliar na produção de novas partículas do vírus (etapa de síntese de proteínas virais). Nessa etapa, o RNA do vírion funciona como RNAm, mas não possui a estrutura cap metilada típica de eucariotos. O que ele possui é um sítio de entrada interna do ribossomo ou IRES que permite a ligação aos ribossomos e o início da síntese proteica. O RNAm é traduzido em uma poliproteína que é então clivada produzindo proteínas virais individuais. A clivagem é realizada principalmente pelas proteases virais, 2A^{pro} e 3C^{pro} ou 3CD^{pro}. Essa estratégia permite a síntese de múltiplos produtos proteicos a partir de um único RNA e ainda a expressão controlada pela taxa e extensão do processamento proteolítico. No entanto, a poliproteína não é observada em células infectadas porque é processada imediatamente após as sequências codificantes das proteases serem traduzidas.

A síntese de RNA ocorre em vesículas induzidas por proteínas virais. O RNA de fita positiva é copiado pela RNA polimerase para formar fitas de RNA de polaridade negativa que então serão copiados para produzir mais fitas de polaridade positiva. No início da infecção, o RNA de polaridade positiva recém-sintetizado é traduzido para produzir proteínas adicionais. Entre as proteínas sintetizadas estão as RNA polimerases e as proteínas acessórias necessárias para replicação do genoma e síntese de RNAm.

Na fase mais tardia da infecção, quando há um número suficiente de proteínas estruturais sintetizadas, ocorre o processo de morfogênese (montagem do capsídeo), onde novas partículas virais são formadas e liberadas por lise da célula (Figura 4).

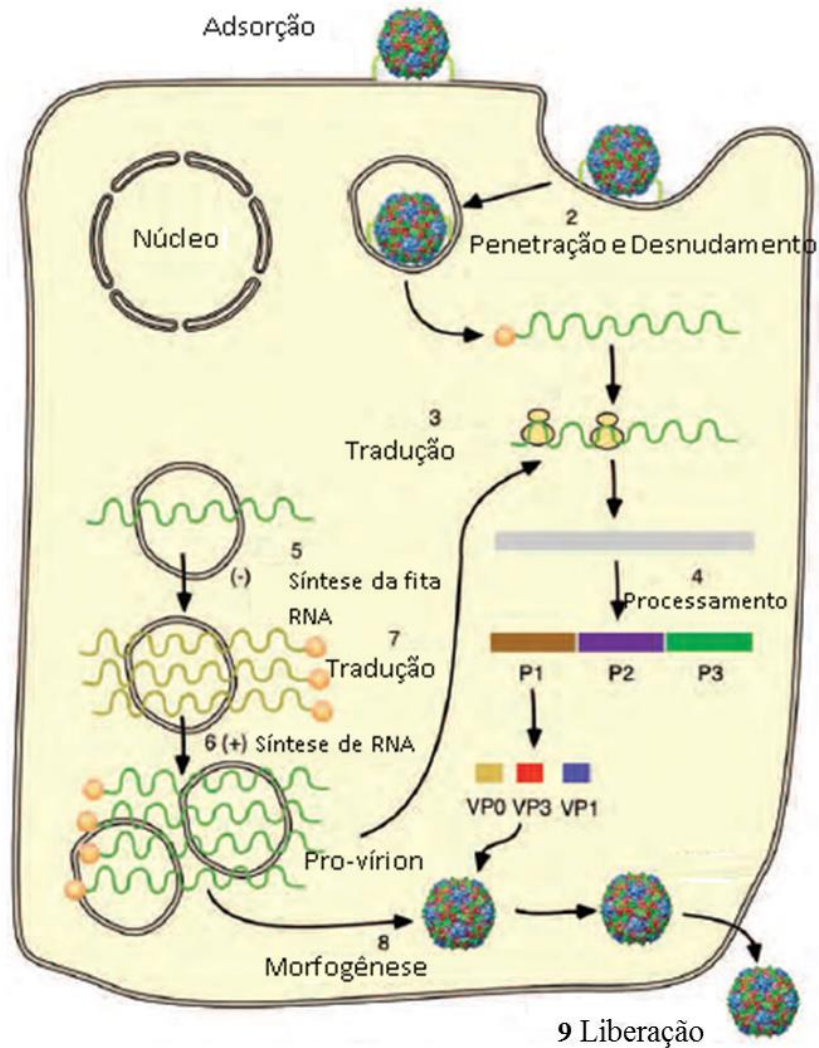


Figura 4 - Diagrama do ciclo de multiplicação dos picornavírus. Adaptado de Racaniello (2013). O vírus se liga a um receptor celular (1) e o genoma é exposto, liberado no citoplasma (2). Durante o desnudamento, a VPg (proteína viral ligada ao genoma) é removida do RNA viral, que é então traduzido (3). A poliproteína é clivada nascente para produzir proteínas virais individuais (4). A síntese de RNA ocorre em vesículas de membrana induzidas por proteínas virais. O RNA de polaridade positiva (+) é copiado pela RNA-polimerase viral para formar o RNA de polaridade negativa (-) (5), que são depois copiados para produzir cópias de RNA de polaridade positiva adicionais (6). No início da infecção, o RNA (+) sintetizado *de novo* é traduzido para produzir proteínas virais adicionais (7). Em pontos mais tardios do ciclo, as fitas de RNA (+) seguem para a via de montagem (morfogênese; 8). Partículas virais recém-sintetizadas são liberadas da célula por lise (9).

Durante a síntese da proteína P1, precursora das proteínas do capsídeo, interações intramoleculares entre superfícies desses domínios levam à formação de unidades estruturais. A proteína P1 é clivada de P2, e depois em VP0+VP3+VP1 pela protease 3CDpro. As etapas finais da morfogênese envolvem clivagem da maioria das moléculas de VP0 a VP4+VP2.

O ciclo de multiplicação dos picornavírus varia de 5 a 10 horas, dependendo de variáveis como vírus, temperatura, célula hospedeira e multiplicidade de infecção. Muitos picornavírus são liberados quando a célula é lisada e perde sua integridade. No entanto, outros picornavírus como o vírus da hepatite A são liberados das células na ausência de efeito citopático.

A família *Picornaviridae* possui vírus que infectam vertebrados, incluindo seres humanos, primatas não-humanos, cavalos, suínos, roedores e pássaros (Flores, 2007; Racaniello, 2013). Em 2007, a presença do Seneca Valley virus (SVV), um picornavírus, atualmente denominado como *Senecavirus A* (ICTV, 2019), foi detectada por meio da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de suínos, com suspeita de enfermidades vesiculares, importados para os Estados Unidos, provenientes do Canadá (Pasma et al., 2008). A relação da doença com esse agente permanecia desconhecida até 2006 (Knowles et al., 2006). No entanto, após crescentes surtos no Brasil em 2015 e no mundo desde 2012 e a ocorrência de isolados e ou detecção do RNA somente do *Senecavirus A* nessas amostras, o vírus começou a ser fortemente associado às doenças vesiculares, como potencial agente causador, embora haja questões que ainda necessitam ser esclarecidas (Yang et al., 2012; Singh et al., 2012, Leme et al., 2017; Segalés et al., 2017).

1.4 *Senecavirus A*

O *Senecavirus A* (SVA), antigamente denominado como *Seneca Valley virus 1 - SVV-001*, é um vírus pertencente à ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae*, gênero *Senecavirus* (ICTV, 2019). Este vírus foi isolado em 2002 como contaminante de células PER.C6 (células transformadas de retinoblasto fetal humano), enquanto vetores baseados em adenovírus eram cultivados nessa célula. Presume-se que a contaminação ocorreu por meio de insumos utilizados na manutenção da célula, como soro fetal bovino ou tripsina (Hales et al., 2008).

Esse vírus possui um genoma de RNA de fita simples polaridade positiva, contendo uma cauda poliA. O genoma consiste de 7280 nucleotídeos, o qual codifica uma única poliproteína (Racaniello, 2013), processada pós-traducionalmente, que codifica para quatro proteínas do capsídeo (VP1-4) e sete proteínas não estruturais. Além disso, possui um conteúdo de G+C, em % mol, de 51,6 % e apresenta uma fase aberta de leitura (*Open Reading Frame - ORF*) com potencial para codificar uma poliproteína de 2881 aminoácidos (aa). Ainda, pode-se citar que há uma longa região não traduzida (*untranslated region- UTR*) 5' e uma curta região 3' UTR (Hales et al., 2008) (Figura 5).

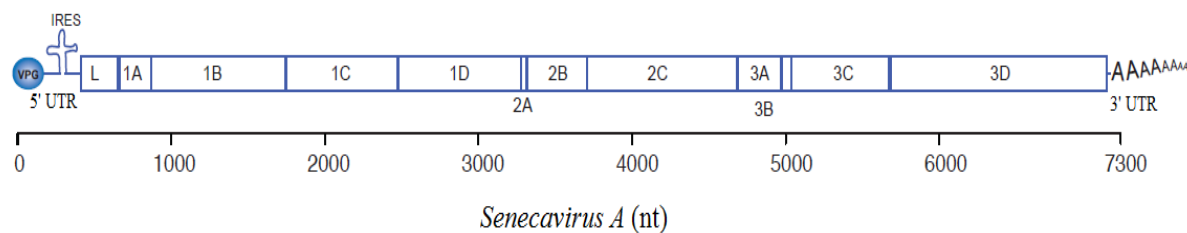


Figura 5 - Organização do genoma do *Senecavirus A*. Fonte: Adaptado de Hales et al. (2008).

As proteínas não estruturais 2Apro, 3Cpro e 3CDpro estão envolvidas no processamento de proteínas virais e as proteínas não estruturais 2B, 2C, 3AB, 3BVPg, 3CDpro e 3Dpol, associadas à replicação do vírus (Racaniello, 2013). A região 5' UTR possui um local interno de entrada do ribossomo (IRES), cuja função é permitir a tradução independente do RNA viral, inibindo a tradução do RNA celular (Willcocks et al., 2011). A região 3B codifica para a proteína Vpg que atua como iniciador na síntese do RNA viral. As proteínas não estruturais 3C e 3D são, respectivamente, proteinase e o maior componente da RNA polimerase dependente de RNA (Hales et al., 2008).

As sequências do genoma do *Senecavirus A* obtidas por Hales et al. (2008) e as análises filogenéticas realizadas por eles demonstraram que esse vírus é um membro da família *Picornaviridae* e possui sequências similares a dos membros do gênero *Cardiovirus*. Além disso, essas análises assumiram um papel importante para as descobertas recentes de que o vírus tem importantes propriedades oncolíticas (Hales et al., 2008).

O vírus em questão possui atividade oncolítica direcionada para células tumorais com características neuroendócrinas como células tumorais de pulmão e outros tipos de cânceres sólidos pediátricos. No entanto, o SVA não causa efeitos deletérios em células normais (Reddy et al., 2007). Devido ao fato do *Senecavirus A* ser conhecido por alvejar células com essas características, é possível que o seu tropismo celular seja regulado por meio da ligação a receptores expressos em tais células tumorais. Exemplos desses receptores são os receptores de integrinas e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Venkataraman et al., 2008).

Outra questão importante é o pequeno tamanho do SVA e a ausência de envelope, características que podem ajudá-lo a ser rapidamente disseminado nas células tumorais, permitindo a eficácia no tratamento por via intravenosa, no que diz respeito a tumores neuroendócrinos (Reddy et al., 2007). O SVA tem um ciclo de replicação de 12 horas, promovendo a infecção produtiva no interior dos tumores antes do desenvolvimento de uma resposta imune (Rudin et al., 2011).

As células tumorais que são capazes de ligar e internalizar o SVA suportam a replicação do vírus e são mortas por lise durante a fase lítica de replicação. Os vírions recém-formados são então capazes de infectar as células tumorais adjacentes, repetindo o ciclo de replicação (Wadhwa et al., 2007).

Pesquisas sorológicas confirmaram a presença de anticorpos específicos para *Senecavirus A* em bovinos, suínos e em camundongos, mas não em seres humanos (Knowles et al., 2006). Acreditava-se que os suínos eram os hospedeiros naturais do SVA (Hales et al., 2008). No entanto, não havia uma relação clara do vírus com a doença em suínos (Knowles et al., 2006).

Suínos inoculados com dois isolados do SVA não apresentaram nenhum sinal de doença (Knowles et al., 2006). De maneira semelhante, suínos livres de patógenos específicos (SPF) inoculados em cargas virais diferentes do SVA não apresentaram sinais clínicos de enfermidade: um grupo contendo dois animais inoculados com sobrenadante de cultura de células infectadas com o vírus na concentração de 10^8 PFU/suíno e outro grupo também de dois animais inoculados com partículas purificadas do SVA (5×10^{11} partículas/suíno). Um animal de cada grupo foi novamente inoculado com o SVA após 30 dias (Yang et al., 2012).

Alguns anos depois, porém, Montiel et al. (2016) inocularam oito suínos de nove semanas com a amostra viral SD15-26 ($10^{8.07}$ TCID₅₀/mL) e os sinais clínicos foram observados em torno dos dias 4-5 p.i. (pós inoculação) e durou aproximadamente 10-12 dias. Joshi et al. (2016b) realizaram infecção experimental em suínos e relataram o surgimento de lesões vesiculares nos animais infectados no dia 4 p.i. no focinho e / ou nos pés, afetando as bandas coronárias, o espaço interdigital e o calcanhar / casco dos animais infectados. Uma viremia de curto prazo foi observada entre os dias 3 e 10 p.i., enquanto o vírus foi detectado entre os dias 1 e 28 p.i. nas secreções orais e nasais e nas fezes. Os autores detectaram o RNA do SVA também em animais convalescentes e apontam que seria importante avaliar se o vírus infeccioso poderia ser recuperado a partir de tecidos ou secreções/excreções desses tipos de animais em condições fisiológicas normais ou, talvez, após estímulos estressantes.

A associação do SVA com doença era especulativa, porque este vírus podia ser isolado de suínos clinicamente saudáveis, e outros vírus já foram detectados em amostras de suínos clinicamente afetados, em que também se demonstrou o SVA. Na verdade, esse cenário é bastante típico de doenças multifatoriais com agentes infecciosos, como as ocasionadas pelo circovírus suíno do tipo 2 (PCV2). Portanto, é muito provável que o SVA possa causar

doenças em certos cenários, com coinfeções que ainda não foram esclarecidas (Segalés et al., 2017).

Joshi et al. (2016a) detectaram o RNA do SVA em amostras de swab de lesões em suínos apresentando sintomas clínicos de enfermidades vesiculares e ainda em resíduo de alimentação dentro de caixas de iscas de roedores, amostras ambientais (cabine de veículo, balde, poeira de exaustores, terra, etc), fezes de ratos e intestino de camundongo. Além disso, o vírus foi detectado em moscas presentes em fazendas contendo somente animais saudáveis e em fazendas, onde havia relato de doença vesicular.

Esses achados podem contribuir para o entendimento de que a disseminação do vírus pode ocorrer diretamente, através do contato entre os animais na mesma instalação e, indiretamente, com o agente viral contaminando o meio ambiente. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o papel dessas secreções/excreções na transmissão do SVA em condições de campo (Leme et al., 2017).

Maggioli et al. (2018) descrevem a dinâmica de infecção do *Senecavirus A* após estudo experimental em suínos utilizando a amostra SVA-SD15-26 (isolada em 2015 nos Estados Unidos - acesso GenBank KX778101). Após um período de curto de incubação (3 a 5 dias), animais inoculados com o SVA apresentaram sinais clínicos caracterizados por letargia e claudicação. Foi observada viremia a curto prazo com a detecção do RNA viral no soro entre os dias 1 e 10 p.i. Uma resposta de anticorpos neutralizantes (AN) foi detectada por volta do dia 4 ou 5 p.i., com altos títulos de AN detectados até 35 a 38 dias p.i. Houve correlação entre a resposta de AN com níveis reduzidos de viremia. As respostas de células T específicas para SVA foram caracterizadas por uma frequência aumentada de células T $\alpha\beta$, especialmente células T CD4 +, produzindo IFN- γ . Estas células foram detectadas pela primeira vez por volta do dia 7 p.i. e aumento da frequência até o dia 14 p.i. A frequência de células T CD8 + e CD4 + CD8 + duplamente positivas (células T efetoras / de memória) expressando IFN- γ ou proliferando em resposta ao SVA aumentou após o dia 10 p.i. Além disso, ocorreu estimulação das células T após a resolução da doença no dia 35 p.i. e uma frequência aumentada de células T CD4 +, CD8 + e CD4 + CD8 + específicas para SVA, sugerindo a indução eficiente de populações de células T de memória. A presença de vírus nas fezes e nas secreções nasais e orais foi detectada até 21 a 28 dias p.i. O vírus infeccioso foi isolado das secreções nasais, fezes e secreções orais até os dias 7, 14 e 21 dias p.i., respectivamente.

Fernandes et al. (2018) compararam a patogenidade e a dinâmica de infecção de duas amostras de SVA, uma histórica (SVV 001) e a contemporânea (SD15-26) e verificaram que ambas as amostras infectaram os animais do estudo (n=12) por via oronasal. Além disso, foi observada viremia até o dia 10 p.i. e respostas imune celular pela avaliação da expressão de IFN- γ pelas células T (CD3 + total) e T individual e subconjuntos de células incluindo CD4 +, CD4 + CD8 + e CD8 +). Embora essas amostras apresentem 93,8 % de identidade em relação às sequências do genoma completo, no que se refere à sintomatologia, a infecção com a amostra SD15-26 resultou em sintomas clínicos característicos com a presença de vesículas. A amostra SVV 001, em contrapartida, não causou doença clínica nos animais inoculados permanecendo clinicamente normais durante o experimento. A amostra SD15-26 apresentou múltiplas alterações nucleotídicas envolvendo as regiões 5' e 3' UTRs e a ORF longa que codifica para a poliproteína. Esses resultados indicaram que a amostra histórica é de baixa virulência, entretanto, o papel das mudanças genéticas ainda permanece desconhecido. Acredita-se que o surgimento de amostras virulentas do SVA contemporâneo tenha sido contribuído dada a extensão e distribuição dessas mudanças (envolvendo regiões codificantes e não codificantes).

De 2007 a 2014, dezessete (17) trabalhos sobre o *Senecavirus A* tinham sido publicados. Até essa data, somente três (3) haviam reportado o vírus em amostras de suínos dos Estados Unidos e Canadá, relacionando o vírus como potencial agente causador de doenças vesiculares nos suínos (Pasma et al., 2008; Yang et al., 2012; Singh et al., 2012). Este fato tem contribuído para um crescente aumento na produção científica a respeito do SVA nos últimos anos, o que aponta ainda para a necessidade de pesquisas básicas e aplicadas acerca desse vírus emergente. De 2015 a 2019, mais de 60 artigos científicos indexados foram publicados, sendo que muito deles tem associado o SVA como agente causador de enfermidades vesiculares.

O vírus foi isolado em suínos de sete estados dos Estados Unidos (12 isolados). Análises filogenéticas desses isolados sugeriram que o SVA é amplamente distribuído, tanto temporal como geograficamente (Hales et al., 2008).

No Brasil, o primeiro surto de enfermidade vesicular envolvendo o SVA ocorreu em 2014-2015 em granjas de suínos pertencentes a seis estados (Leme et al., 2015; Vannucci et al., 2015). O vírus foi detectado em amostras de epitélio de língua, focinho, líquido de vesículas e soro sanguíneo de suínos por técnicas moleculares como a RT-PCR (Leme et al.,

2015; Laguardia-Nascimento et al., 2016) e pelo sequenciamento paralelo massivo (Vannucci et al., 2015).

Brasil, Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, Tailândia e Vietnã são os países que já relataram este vírus emergente relacionado à doença vesicular de suíno (Pasma et al., 2008; Zhang et al., 2015; Leme et al., 2015; Vannucci et al., 2015; Joshi et al., 2016; Canning et al., 2016; Wang et al., 2016; Hause et al., 2016; Guo et al., 2016; Tousignant et al., 2017; Qian et al., 2016; Wu et al., 2017; Saeng-Chuto et al., 2017; Sun et al., 2017; Arzt et al., 2019). A descrição do SVA na Ásia e nas Américas sugere que o SVA não é restrito a uma área geográfica e pode ser distribuído em escala global no futuro (Leme et al., 2017).

Investigações epidemiológicas deveriam ser conduzidas onde o vírus nunca foi relatado, inclusive em locais onde a produção de suínos é extensa, cuja infecção pelo SVA pode ter maior relevância econômica. No momento, não há também vacinas disponíveis para o *Senecavirus A*, portanto, as práticas sanitárias e de biossegurança devem incluir medidas profiláticas e de controle que incluam o rebanho, os animais e o meio ambiente. Estes autores apontam também que ainda precisam ser respondidas questões relacionadas às características específicas do vírus, incluindo sua evolução biológica e molecular, estabilidade em diferentes condições físicas, receptores e co-receptores, ciclo de replicação, sobrevivência ambiental e epidemiologia do SVA. Além disso, a forma como o vírus foi disseminado para outros países, reservatórios e / ou vetores de espécies não relacionadas aos suídeos; patogenicidade em leitões; e por último, resposta imunológica do hospedeiro, incluindo títulos de anticorpos protetores no colostro (Leme et al., 2017).

As lesões vesiculares no suíno podem ser causadas por vírus relacionados a enfermidades como a febre aftosa, doença vesicular, estomatite vesicular e exantema vesicular (Segalés et al., 2017). Essas enfermidades e a associada ao SVA possuem sinais clínicos indistinguíveis. Nesse seguimento, o diagnóstico diferencial é relevante, principalmente pelo fato de envolver a febre aftosa que é considerada uma doença de notificação compulsória pela Organização Mundial de Saúde Animal e que induz perdas econômicas consideráveis (OIE, 2017).

O diagnóstico de SVA pode ser realizado por isolamento viral, detecção de anticorpos, técnicas histopatológicas e ferramentas moleculares. A RT-PCR convencional, a RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), o sequenciamento paralelo massivo e amplificação isotérmica em tempo real mediada por loop são os ensaios moleculares já descritos para SVA. A RT-qPCR,

por exemplo, tem vantagens por ser rápida, sensível, específica e aplicada em diferentes amostras biológicas, como tonsilas, fezes e fluidos vesiculares (Leme et al., 2017).

Técnicas moleculares como a RT-PCR e a RT-qPCR têm sido empregadas também em surtos. Cattoli e Capua (2006) discutem a aplicação dessas ferramentas em surtos de influenza aviária, uma vez que o teste de escolha para detecção dos vírus é o isolamento em ovos embrionários ou culturas de células. Este teste, no entanto, muitas vezes não é compatível com as exigências da indústria avícola devido ao elevado tempo de execução até o resultado final. Além disso, o atraso na movimentação de aves de um local, enquanto aguarda o resultado do isolamento viral, muitas vezes resulta em questões de bem-estar animal. Morsink e colaboradores (2012) também mostraram a aplicação da PCR no contexto de cenários de surtos bacterianos (surto de *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* metilina resistente, *Acinetobacter baumannii* e de *Burkholderia cepacia*).

1.5 Surtos em granjas no Brasil - amostras enviadas para serviço oficial de suspeita de enfermidades vesiculares

Em fevereiro de 2015, o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária Nacional (LFDA), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, pertencente à rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recebeu amostras de epitélio, líquido de vesícula e soros de suínos de granjas de diferentes estados brasileiros, com suspeita de enfermidade vesicular. Os surtos já estavam ocorrendo desde 2014 (Vannucci et al., 2015).

Inicialmente, o LFDA-MG recebeu amostras de epitélio de suíno de três municípios do estado de Goiás. No município de Varjão, as amostras foram coletadas de fêmeas alojadas na maternidade e que apresentavam lesões ulceradas na mucosa do focinho. Em leitões, foram observados quadros de diarreia e alta taxa de mortalidade. Além desse município, foram coletadas amostras em granjas localizadas em Santo Antônio da Barra e Rio Verde. Nesse último município, foi enviado também material de um leitão necropsiado (pulmão, líquido peritoneal, amígdalas, linfonodo e epitélio da língua). De acordo com os formulários de coleta de amostras enviados juntamente com as amostras, os animais apresentaram claudicação, descolamento e lesões cicatriciais na muralha do casco.

Posteriormente, foram recebidas amostras de soros sanguíneos, epitélios, líquido vesicular e swab de lesão de animais do município de Uberlândia, localizado no estado de Minas Gerais. Durante o atendimento às granjas, efetuado pelo serviço de defesa sanitária, foram encontradas fêmeas reprodutoras com lesões vesiculares no focinho e coroa do casco (Figura 6).

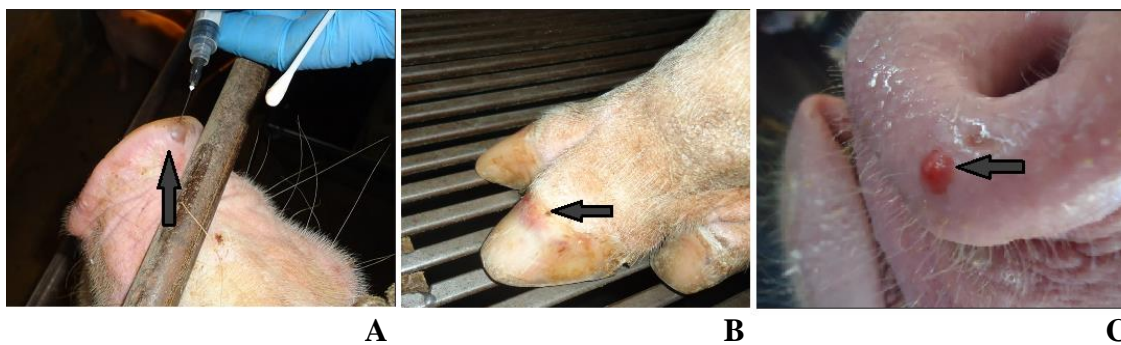


Figura 6 - Lesões vesiculares em focinho (A e C) e hiperemia da coroa do casco de fêmeas reprodutoras (B) de granja do município de Uberlândia (MG). Fonte: Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA-MG).

Em seguida, foram recebidas amostras de epitélio e líquido vesicular de suínos do município de Westfália, localizado no estado do Rio Grande do Sul. Do mesmo modo que nos estados de Minas Gerais e Goiás, as amostras foram coletadas de fêmeas reprodutoras e leitões que apresentavam lesões vesiculares no nariz e patas. Além disso, nestas propriedades, os leitões apresentavam quadros graves de diarreia amarelada.

Provenientes de animais com sintomas semelhantes aos descritos anteriormente, o LFDA-MG recebeu amostras de suínos de outros três estados brasileiros: Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso. Os municípios referentes à Santa Catarina foram: Concórdia, Arabutá, Campos Novos, Seara, Cordilheira Alta, Videira, Ipumirim, Xavantina, Herval d'Oeste, Presidente Castelo Branco, Vargem Bonita, Irani, Salto Veloso, Arabutã e Itá. Já no Paraná, os seguintes municípios enviaram amostras: Toledo, Realeza, Catanduvas, Três Barras do Paraná, Fazenda Rio Grande, Capitão Leonidas Marques, Ampere, Cascável, Nova Santa Rosa, Guaraniaçu, Tupãssi, Santa Helena, Marechal Cândido Rondon, Serranópolis do Iguçu, Medianeira, Missal, Assis Chateaubriand e Cambira. Além disso, foram recebidas amostras do Mato Grosso (Tapurah) e mais amostras do Rio Grande do Sul de outros municípios (Gentil, Santa Rosa, Três Arroios, Campinas do Sul, Marcelino Ramos, Mariano Mouro, Gaurama, Três Arroios, Severiano de Almeida, Gentil, Santa Rosa, Campinas do Sul, Carlos Barbosa e Estrela).

O laboratório oficial do MAPA recebeu, no ano de 2015, um total de 1377 amostras de seis estados brasileiros (Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso) (figura 7), o que indica que o surto não era restrito a uma determinada região.



Figura 7 - Mapeamento da coleta de amostras biológicas de suínos provenientes dos surtos de doenças vesiculares. Balões vermelhos indicam as cidades de amostragem (53 municípios). Fonte: Google Maps.

O único agente detectado por RT-PCR nas amostras recebidas foi o *Senecavirus A* (alvo gene 3D). No entanto, em uma amostra de MG ocorreu a detecção simultânea do genoma desse agente com o do vírus da Diarréia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus - BVDV*), o que poderia sugerir coinfeção. Porém, o isolamento viral positivo em culturas de células não ocorreu em nenhuma amostra (Languardia-Nascimento et al., 2016).

Em 2017, o LFDA-MG recebeu novamente amostras de suínos (soro sanguíneo, epitélio de pata, boca e focinho) de surtos de enfermidades vesiculares e no município Lucas do Rio Verde (Mato Grosso), e houve a detecção do *Senecavirus A* por isolamento viral, bem como do RNA viral.

Os surtos continuaram surgindo, uma vez que em 2018, no município de Dois Lajeados, Rio Grande do Sul, houve a detecção do RNA e o isolamento do vírus. Em 2019, até final de fevereiro, o RNA do SVA foi detectado nos municípios de Rio Verde (GO), Jataí (GO), Serafina Corrêa (RS), Tapurah (MT), Três Barras do Paraná (PR), Irani (SC) e Santa Cecília (SC). Estes achados comprovam que o SVA continua a circular no Brasil, induzindo surtos de doenças vesiculares em suínos, em pelo menos seis dos estados nacionais.

1.6 PCR digital

A PCR Digital (dPCR) representa um tipo especial de PCR, a qual objetiva amplificar um molde de DNA a partir de amostras minimamente diluídas. Em seguida, ocorre a geração de produtos de amplificação que são exclusivamente derivados de um molde e podem ser detectados com diferentes fluoróforos (Pohl; Shih Ie, 2004).

O termo PCR digital originou no campo dos computadores digitais, onde os cálculos realizados em circuitos lógicos permitem saídas binárias (0 ou 1). A vantagem dos sinais digitais é a facilidade de detecção, o qual necessita distinguir apenas sinais baixos ou altos. Aplicando-se esse conceito na área biológica, simplifica a instrumentação, pois é necessário apenas reconhecer uma partição positiva de uma negativa (Basu et al., 2017).

Esta tecnologia omite a necessidade de utilizar materiais de referência com concentrações de alvo conhecidas e aumenta a precisão da quantificação alvo em concentrações baixas, em comparação com a PCR em tempo real (Gullett; Nolte, 2015). Outra vantagem da dPCR é a elevada resistência aos inibidores de diferentes tipos de amostras (Gutiérrez-Aguirre et al., 2015).

A principal diferença entre PCR digital e em tempo real se dá principalmente na medição das sequências alvo. Em qPCR, a reação é monitorada durante todo o processo de amplificação e quantificação e baseia-se na análise do sinal fluorescente na fase exponencial. Em contraste, a dPCR coleta sinais de fluorescência por meio da medição do ponto final, assim como a PCR convencional e, utiliza o número de partições positivas para quantificar a amostra (Quan et al., 2018) (Figura 8).

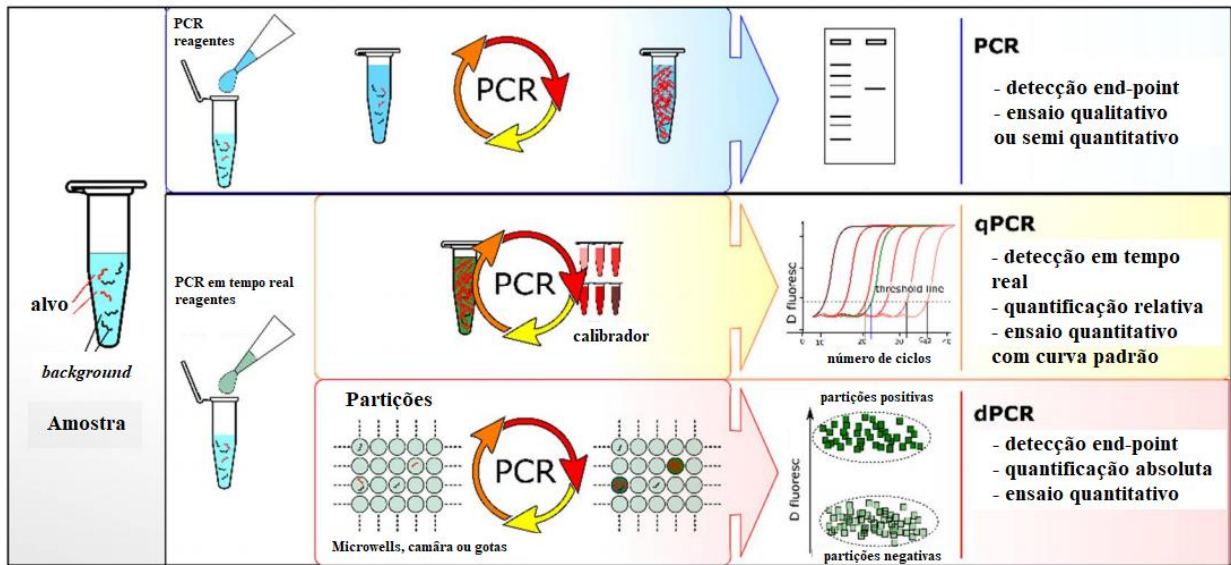


Figura 8 – Comparação das técnicas de PCR. Na PCR convencional, os produtos amplificados são analisados por eletroforese no final da reação (*end-point*) e detectados por sinal fluorescente com o uso de agentes intercalantes de DNA. Nas PCRs em tempo real e digital, são utilizados os mesmos insumos de amplificação e sistemas fluorescentes de detecção. No entanto, naquela, a quantidade de DNA amplificado é medida em todo ciclo, “em tempo real”, e a quantidade “absoluta” é interpolada com o uso de curvas padrão. Por outro lado, na PCR digital, antes da amplificação, há uma etapa de partição de modo que cada partição contenha uma ou poucas moléculas de material genético. Após a PCR, a proporção de partições positivas serve para calcular de forma absoluta a concentração da sequência alvo. Adaptada de Quan et al. (2018).

No que se refere à quantificação pela PCR digital em gotas, é estimado a probabilidade p considerando a distribuição aleatória de m moléculas em n partições. Esse processo é considerado binomial, uma vez que a resposta é presente ou ausente. A chance de uma molécula alvo estar em uma partição é $1/n$, porque resulta de eventos aleatórios ou independentes (Quan et al., 2018).

A distribuição de sequências alvo em partições é descrita pela distribuição de Poisson, que prevê a proporção de partições contendo um determinado número de sequências permitindo, assim, a quantificação exata e absoluta do alvo a partir da razão de positivo contra todas as partições no final da reação (Gutiérrez-Aguirre et al., 2015; Quan et al., 2018). Segundo Vynck e colaboradores (2018), há parâmetros que influenciam no poder do cálculo como o número de partições e a fração de partições negativas ou positivas.

Há dois tipos de métodos de partição da PCR digital que são o de câmaras e o de gotas. Ambos os métodos possuem benefícios, mas a PCR digital de gotas (*droplet digital PCR*-ddPCR) obtém um maior número de partições que fornecem uma quantificação mais

confiável (Basu, 2017). Nesse processo de gotas, a reação de PCR contendo o material genético é emulsificada e particionada gerando gotas contendo uma ou zero moléculas alvo sob orientação da distribuição de Poisson. Os casos excepcionais com dois ou mais alvos gerariam intensidade de fluorescência incomum que geralmente são eliminados (Cao et al., 2017). Após a partição, ocorre a amplificação dos alvos presentes nas gotas e, por conseguinte, cada gota é analisada individualmente por um sistema de detecção que detecta fluorescência em dois comprimentos de onda (FAM ou VIC/HEX) (BIO-RAD, Califórnia, EUA) (figura 9).

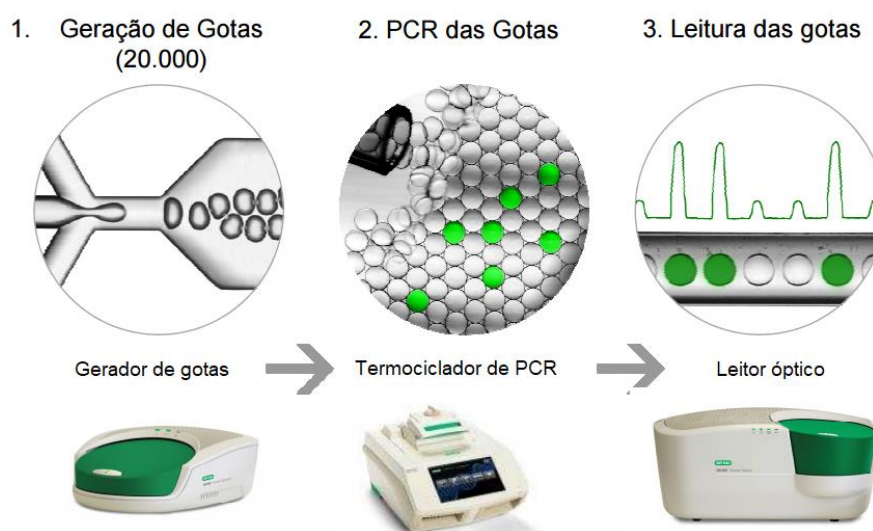


Figura 9 - Esquema simplificado da reação de PCR digital em gotas (BIO-RAD, Califórnia, EUA).

Nos últimos dois anos, houve um crescente número de trabalhos utilizando a PCR digital em gotas na detecção de vírus de seres humanos e animais como sorotipos 4 e 10 de adenovírus (Dong et al., 2018), *Human T-lymphotropic virus 1 and 2* (HTLV-1 e HTLV-2; Thulin et al., 2018), *Dengue virus* (Abachin et al., 2018), *Pseudorabies virus* (Ren et al., 2018), *African swine fever virus* (Wu et al., 2018), *Japanese encephalitis virus* (Wu et al., 2017), *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (Yang et al., 2017), *Orthopoxvirus* (Americo et al., 2017), *Merkel cell polyomavirus* (Arvia et al., 2017), *Infectious hematopoietic necrosis virus* (Jia et al., 2017), *Human papilloma virus* (Lillsunde Larsson et al., 2017), *Human immunodeficiency virus* (Dunay et al., 2017) e *Hepatitis E virus* (Nicot et al., 2016). No entanto, desde o início do presente doutoramento, não havia PCR digital para o vírus da Febre Aftosa ou para o *Senecavirus A*, testes que foram desenvolvidos e

publicados durante este trabalho (Pinheiro de Oliveira et al., 2018; Pinheiro de Oliveira et al., 2019).

A PCR digital (dPCR) tem sido aplicada em experimentos, os quais requerem quantificação acurada e precisa ou na capacidade de detectar mutantes ou sequências raras (Basu, 2017). Exemplos de aplicação incluem a detecção de biomarcadores (Zec et al., 2014), micro-RNAs (Zhao et al., 2018), nos processos de doença (Bernard et al., 2018), na quantificação de carga viral (Bartolini et al., 2018) ou de outros patógenos em pequenas quantidades (Li et al., 2018) e expressão gênica (Gautier et al., 2018).

Ainda pode-se citar que a dPCR tem sido aplicada em etapas do sequenciamento paralelo massivo como a metagenômica, a fim de adquirir quantificação precisa e acurada (Laurie et al., 2013; Aigrain et al., 2016; Vossen et al., 2017, Heredia, 2018). Este método tem sido bem-sucedido ao reduzir o volume de amostra necessário em mais de 1000 vezes, evitando um passo de pré-amplificação, o que minimiza os efeitos indesejáveis de viés decorrentes de várias etapas de manipulação da amostra (Cao et al., 2017).

1.7 Metagenômica viral

Outro exemplo de ferramenta molecular com aplicações crescentes, inclusive em materiais provenientes de surtos, é a análise metagenômica, a qual é capaz de sequenciar todo o conteúdo microbiológico de uma amostra clínica (Karlsson et al., 2013). O reconhecimento de que a maioria dos microrganismos no ambiente não pode ser cultivada por métodos padrão estimulou o desenvolvimento da metagenômica (Schloss; Handelsman, 2003).

O termo “metagenômica” foi cunhado com o significado de análise do conjunto dos genomas de organismos de um determinado ambiente (Riesenfeld et al., 2004). Essa análise genômica de microrganismos não cultiváveis utiliza uma abordagem baseada na expressão ou no sequenciamento de uma mistura de genomas de microrganismos (Schloss; Handelsman, 2003; Riesenfeld et al., 2004).

Estudos de metagenômica são realizados em uma variedade de ambientes, incluindo solos, oceanos, ar, plantas e diferentes espécies animais. Essa tecnologia é utilizada também para identificar novas espécies microbianas e para elucidar as funções de vírus em diferentes ambientes (Nelson, 2013).

Segundo Wylie e colaboradores (2012), a definição da metagenômica viral ou viroma de uma amostra é um passo importante para entender como os microrganismos afetam a saúde e a doença humana. Esse conceito pode ser estendido para amostras de animais, plantas e

demais organismos. O viroma é então uma coleção de todos os vírus presentes, incluindo vírus que causam infecções agudas, persistentes, ou infecção latente e vírus integrado no genoma do hospedeiro, como retrovírus endógenos. Além disso, inclui vírus de eucariotos e procariotos (bacteriófagos), sendo aqueles com importante efeito na saúde humana ou de outras espécies. Assim como os plasmídeos bacterianos, os bacteriófagos servem como reservatórios para elementos genéticos móveis nas bactérias. Nesse contexto, os bacteriófagos podem afetar a saúde contribuindo ou alterando as capacidades metabólicas da comunidade bacteriana residente.

A identificação de novos vírus é uma parte importante na caracterização do viroma, sendo que os vírus desconhecidos podem afetar também a saúde, quer de forma aguda ou por meio de infecção crônica (Wylie et al., 2012). A figura 10 apresenta os componentes do viroma e o papel dos vírus dentro de comunidades microbianas complexas.

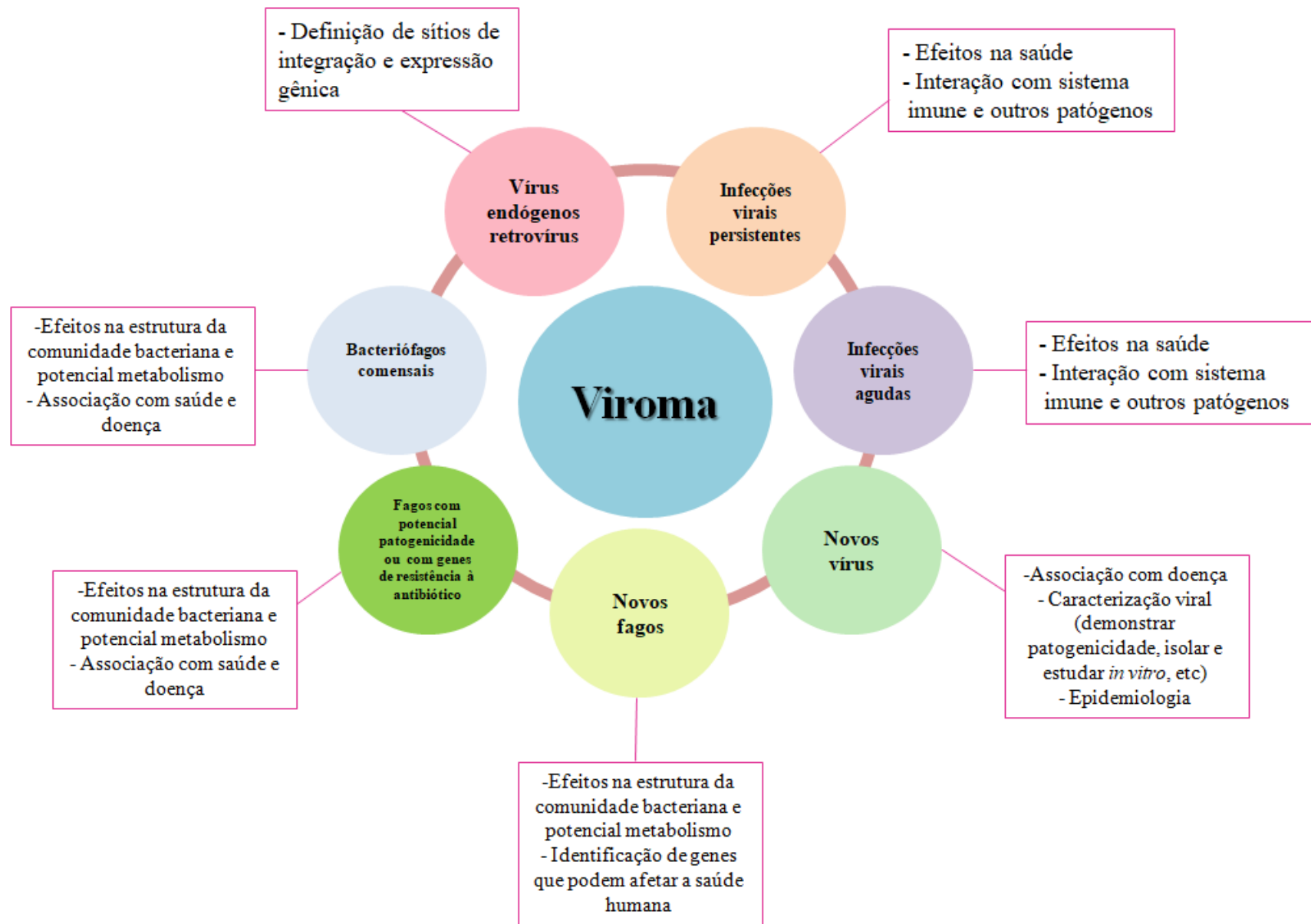


Figura 10 – Componentes de um viroma. Adaptado de Wylie et al. (2012).

Recentemente, as técnicas de metagenômica e plataformas de sequenciamento paralelo massivo têm permitido a descoberta de muitos vírus (Castrignano; Nagasse-Sugahara, 2015). Ainda, pode-se citar que, a aplicação de métodos de descoberta de vírus usando técnicas independentes de cultivo tem auxiliado laboratórios de referência no diagnóstico de doenças acometendo seres humanos e animais (Svraka et al., 2010; Belák et al., 2013).

A abordagem metagenômica viral envolve etapas como coleta das amostras, purificação e concentração das partículas virais ou do ácido nucleico viral (Ambrose; Clewley, 2006; Tang; Chiu, 2010; Li; Delwart, 2011). A quantidade de amostra coletada deve ser representativa, de forma a refletir a realidade da população da qual foi retirada (Wooley et al., 2010).

Além dessas etapas, também ocorrem a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação aleatória dos segmentos de ácidos nucleicos e análises das sequências utilizando métodos de bioinformática (Ambrose; Clewley, 2006; Tang; Chiu, 2010; Li; Delwart, 2011). A extração de ácido nucleico é uma etapa importante, pois a qualidade da análise metagenômica é diretamente relacionada com a qualidade de material genético extraído (Green; Keller 2006).

Métodos de extração que reduzem a quantidade de ácido nucleico do hospedeiro e que diminuam custo e tempo na preparação das amostras para sequenciamento paralelo massivo são requeridos (Kohl et al., 2015). Em caso de amostras em baixas concentrações, técnicas de amplificação de DNA ou cDNA como as que utilizam iniciadores aleatórios são recomendadas (Green; Keller, 2006).

A chegada de métodos de sequenciamento paralelo massivo revolucionou a base da abordagem científica em termos de investigação e clínica, sendo capaz de obter uma enorme quantidade de dados. A possibilidade de sequenciar o genoma completo de vários organismos impulsionou estudos evolucionários em larga escala, os quais seriam impossíveis de serem concretizados há apenas alguns anos com o sequenciamento tradicional de Sanger (Metzker, 2010).

Em termos práticos, existem diferentes abordagens que compõem a metagenômica. Apesar de se diferenciarem consideravelmente entre si, os sequenciadores de NGS baseiam-se no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA (Metzker, 2010). A plataforma Illumina é a mais utilizada para o sequenciamento metagenômico (Bentley et al., 2008).

Em 2010, a Illumina (San Diego, Califórnia, EUA) adquiriu um instrumento para sequenciamento paralelo massivo, o HiSeq, e um ano após, lançou o MiSeq Illumina, destinado a laboratórios menores e ao mercado de diagnóstico clínico (Liu et al., 2012; Quail

et al., 2012). Essas tecnologias apresentam, de forma simplificada, o seguinte funcionamento: fragmentos de DNA ligados a adaptadores gerados na construção da biblioteca são desnaturados, e as fitas simples são introduzidas numa célula de fluxo (*flow cell*) que possui adaptadores imobilizados complementares aos presentes nos fragmentos de DNA. A amplificação por ponte permite que dentro da célula de fluxo sejam formados diminutos *clusters* ou agrupamentos compostos por milhares de cópias clonais de um mesmo fragmento. Estas cópias são então desnaturadas e sequenciadas pelo método de terminação de cadeia, contendo dideoxinucleotídeos marcados por diferentes fluoróforos (Bentley et al., 2008; Liu et al., 2012) (Figura 11).

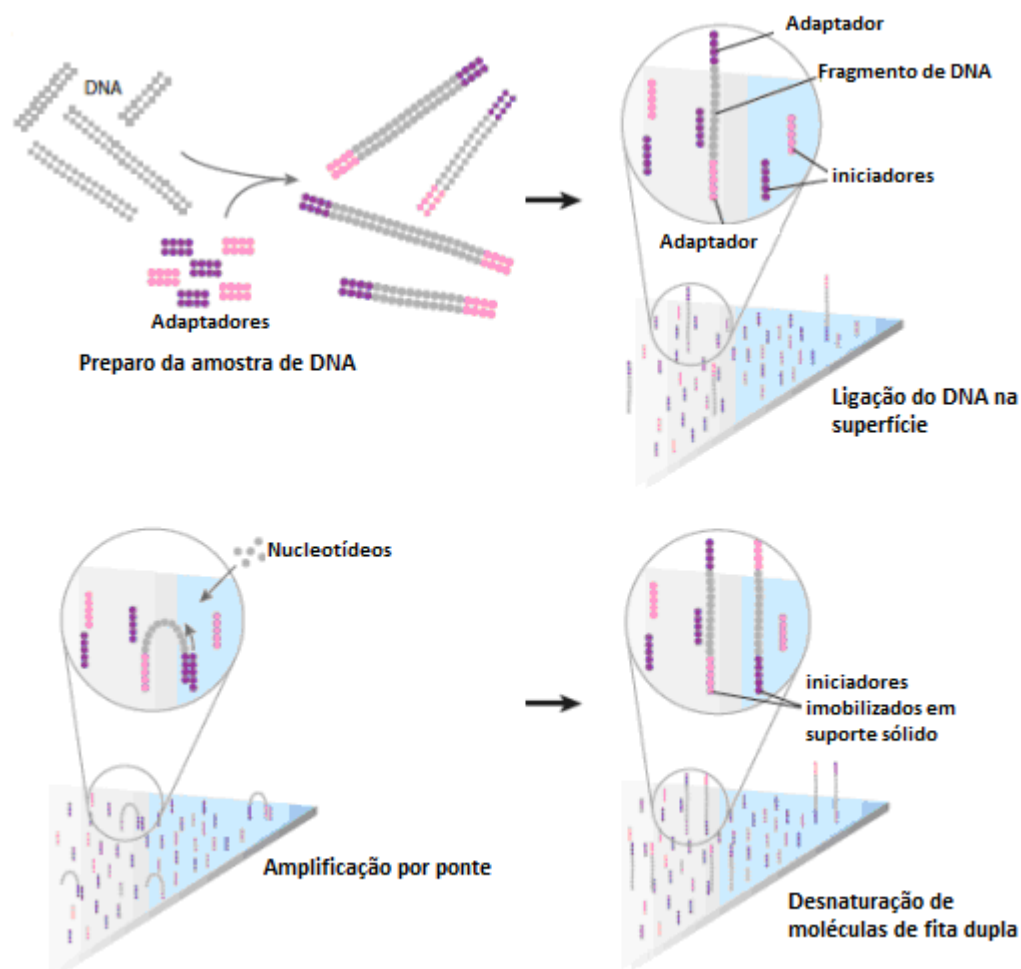


Figura 11 - Processo de sequenciamento do Illumina MiSeq/HiSeq. Adaptado de Mardis (2008).

As plataformas MiSeq e HiSeq diferem em escala, possuindo um elevado rendimento de *reads* (até 1,5 GB e 450 GB por dia, respectivamente). Os dados gerados são similares nas

duas plataformas, mas devido a essas diferenças de rendimento, suportam diferentes aplicações (Caporaso et al., 2012).

A tecnologia Illumina fornece sensibilidade necessária para detectar sequências de vírus raros (Cheval et al., 2011). Uma análise mais aprofundada da diversidade e complexidade do viroma pode ser auferida usando pacotes de *software* disponíveis na literatura como o Metavir (Roux et al., 2011). No entanto, a experiência nos desafios computacionais de análises do viroma ainda é necessária e somente será alcançada à medida que estudos de metagenômica viral se tornem mais difundidos e se encaminhem para aplicações clínicas (Wylie et al., 2012).

Programas computacionais que visam a análise de viromas foram publicados nos últimos anos (Alves et al., 2016; Norling et al., 2016; Bolduc et al., 2017, Amgarten et al., 2017; Lin et al., 2017; Roux et al. 2017; Zhao et al., 2017, Czecko et al., 2017; Rampelli; Turrone, 2018). O MetLab, por exemplo, possui algoritmos implementados em *Python* para estimar a cobertura necessária de metagenomas virais, realizar pré-processamento de conjuntos de dados, eliminar o material do hospedeiro e determinar a classificação taxonômica. Este programa fornece valores de confiança para a detecção dos genomas virais dentro de uma amostra, com base na generalização do teorema de Steven, que permite resolver problemas computacionalmente difíceis, que programas de precisão regulares não manipulariam bem. Além disso, no que tange à classificação taxonômica, é utilizado o Kraken e depois o FragGeneScan, sendo esse último utilizado para predição taxonômica no nível de proteína usando HMMER que utiliza HMMs (*hidden Markov models* – modelos ocultos de Markov) e vFam, que são bancos de dados de perfis, que alcançam uma maior variedade de espécies (Norling et al., 2016).

A crescente atenção em desenvolvimento de *pipelines* visando a abordagem metagenômica viral é um fator positivo, no entanto, há ainda desafios no que diz respeito à escolha do melhor programa. Lindgreen et al. (2016) enfatizam que as ferramentas mais usadas em trabalhos de metagenômica não necessariamente são as mais precisas e que as ferramentas mais precisas não são necessariamente as mais demoradas e que há um elevado grau de variabilidade entre as ferramentas disponíveis. Os autores apontam ainda que as conclusões de qualquer estudo metagenômico são afetadas por erros na composição da comunidade e na capacidade funcional.

Hesse et al. (2017) apontam também que dados de viroma devem ser inspecionados quanto à ocorrência de contaminações de DNA. Estes autores destacam que neste caso,

sequências de proteínas não virais que apresentam semelhança significativa com as proteínas nos bancos de dados serão mal interpretadas como virais. Isso ocorre especialmente quando as amostras forem obtidas de matrizes ambientais complexas e podem conduzir a uma superestimação de genes bacterianos em sequências virais identificadas em trabalhos de viroma. Nesse sentido, a curadoria manual final deve ser realizada de forma criteriosa pelo usuário e/ou bioinformata a fim de certificar os resultados gerados a partir de dados massivos.

A partir de dados massivos pode-se realizar também análises de epidemiologia molecular. Caracterizada como a ciência que lida com monitoramento de biomarcadores, e epidemiologia molecular permite uma compreensão detalhada dos eventos biológicos envolvidos na etiopatogênese das doenças (Cortelli et al., 2007).

Durante surtos, esta ferramenta molecular tem importante aplicação. Trabalhos como os realizados por Kanitz et al. (2014) permitiram identificar em um surto de raiva localizado na região central do Rio Grande do Sul, três sublinhagens do vírus, indicando a co-circulação dos mesmos na região. A epidemiologia molecular também foi aplicada em surtos ocorridos nos Estados Unidos e no México de enfermidade vesicular em equinos, bovinos, alpaca e jumento. Os autores determinaram por meio dessa ferramenta as relações filogenéticas entre as amostras obtidas do vírus da estomatite vesicular New Jersey (VSVNJ) com as provenientes de áreas endêmicas no México (Rainwater-Lovett et al., 2007).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A suinocultura no Brasil vem crescendo ao longo dos anos e ganhando destaque no cenário de produção e exportação mundial da carne suína. Fatores como nutrição, bom manejo da granja, produção integrada, aprimoramento gerencial dos produtores e sanidade contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário mundial. Dentre esses fatores, a saúde animal é uma das principais barreiras não tarifárias para embargo das exportações da carne suína e se constitui um dos principais problemas econômicos para o Brasil, caso esteja comprometida.

As principais enfermidades vesiculares em suínos são a Febre Aftosa, Estomatite Vesicular, Doença Vesicular dos Suínos e Exantema Vesicular dos Suínos. Elas possuem como característica comum a origem viral e o fato de provocarem sintomas clínicos indistinguíveis. De uma forma geral, as enfermidades vesiculares são tratadas como suspeita de Febre Aftosa até que outra causa seja confirmada por meio de testes laboratoriais. Com isso, testes de diagnóstico rápidos e eficazes são requeridos.

O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG), integrante da rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), possui um laboratório de nível 4 de biossegurança – OIE (NB4-OIE), preparado para receber amostras de animais com suspeita de enfermidade vesicular. Em 2015, o LFDA-MG recebeu mais de 1000 amostras de suínos de diferentes estados brasileiros, envolvidos em surtos com suspeita de enfermidade vesicular. O único agente detectado nas amostras do surto, por RT-PCR, foi o *Senecavirus A*, exceto para uma amostra que teve a detecção simultânea do material genético desse vírus com o vírus da diarréia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus - BVDV*), o qual poderia-se pensar em coinfeção). Além disso, nos anos de 2016 a 2019, o LFDA-MG continuou recebendo amostras com suspeita de enfermidades vesiculares.

O SVA nunca havia sido relatado no Brasil, tendo sido detectado oficialmente no LFDA-MG e, primeiramente publicado por dois grupos brasileiros em julho de 2015. A partir desse ano, um crescente número de trabalhos foi publicado, pontuando a necessidade de estudos básicos e aplicados sobre o SVA. Além disso, por meio da metagenômica viral e da PCR digital padronizada pela primeira vez no presente estudo foi possível confirmar o *Senecavirus A*. Ainda sobre a metagenômica viral, foi possível sugerir alguns critérios de

análise de confiança que deveriam ser incluídos nas análises computacionais do viroma a fim de evitar resultados falso positivos ao se deparar com dados massivos.

No caso das amostras destacadas para o estudo no presente projeto, onde o material foi coletado em animais apresentando sinais clínicos vesiculares (havendo a necessidade de triagem de FMDV e outros agentes de doenças vesiculares), a avaliação por abordagem metagenômica favoreceria a caracterização dos agentes presentes, especialmente em situações que não se consegue detectar nenhum agente pelas técnicas vigentes. A dificuldade na recuperação de microrganismos viáveis a partir de amostras provenientes de surtos e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos fatores que dificultam a implementação das ações de defesa sanitária. Nessa perspectiva, a metagenômica é uma ferramenta promissora nas análises genômicas de microrganismos por métodos não cultiváveis, abrindo ainda premissas para a implantação de outros estudos, a partir da análise de microrganismos presentes e produção de sequências de novos microrganismos e sequências de microrganismos já conhecidos, mas, ainda não totalmente estudados.

Outra questão importante é que trabalhos recentes apontaram provas de princípio utilizando o SVA na indução de enfermidades vesiculares em suínos e surgimento de sintomas após inoculação. No entanto, alguns trabalhos não demonstram sucesso na indução de doenças quando utilizados amostras virais históricas, indicando que as amostras virais mais recentes seriam as mais propensas a causar sintomatologia clínica característica. Como a associação do SVA com a enfermidade vesicular em suínos era incipiente, havia muitas questões a serem resolvidas, incluindo a causalidade da doença vesicular por esta infecção viral.

Especialistas na área da suinocultura enfatizavam que não se poderia descartar ainda coinfeções até o presente, uma vez que o SVA foi encontrado não somente em amostras de suínos doentes, mas em animais saudáveis, o que reforçaria as hipóteses de o SVA não estar sozinho como agente causador. Nesse sentido, a metagenômica viral visando a detecção acurada da comunidade viral presente, tornou-se uma ferramenta crucial no que tange aos estudos das enfermidades vesiculares que estão, desde 2015, ocorrendo no Brasil e trazendo preocupações para a economia do país e especialmente para os programas pré-estabelecidos de controle da Febre Aftosa e cenário de exportação de carne bovina e suína.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a presença do *Senecavirus A* e de outros vírus que podem estar associados em co-infecção, em materiais biológicos coletados em surtos de doenças vesiculares envolvendo granjas de suínos de diferentes estados brasileiros, utilizando a abordagem metagenômica viral e PCR digital.

3.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver e padronizar PCR digital para detectar e quantificar o *Senecavirus A* (SVA) e o vírus da Febre Aftosa (FMDV) e também auxiliar no diagnóstico de enfermidades vesiculares;
- Identificar o *Senecavirus A* e outros possíveis agentes virais presentes nas amostras e que poderiam estar envolvidos na indução de enfermidades vesiculares, comparando-os com bancos de dados mundiais;
- Obter o genoma do *Senecavirus A*, a partir das amostras provenientes de diferentes estados e caracterizar filogeneticamente as sequências obtidas.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

No ano de 2015, mil e cento e vinte um (1121) soros de suínos provenientes de propriedades pertencentes a seis estados brasileiros do ano de 2015 com suspeita de enfermidade vesicular foram distribuídos em 147 *pools* por propriedade. Cada pool continha até 20 amostras, conforme sugerido por Batista et al. (2006), visando facilitar a execução dos testes moleculares iniciais para a detecção de amostras positivas. A quantidade de municípios por estado, de onde originaram as amostras, foram as seguintes: MG (01), GO (3), SC (15), PR (18), MT (01) e RS (14). Além disso, um total de 79 amostras de suínos do surto de enfermidades vesiculares ocorridos em diferentes estados brasileiros em 2015 (Tabela 3) foram avaliados, as quais incluem epitélio, soro e líquido vesicular. Algumas amostras de epitélio foram estocadas a -80°C na forma que foram enviadas ao LFDA-MG, e, outras foram maceradas para utilização no isolamento viral.

Tabela 3 - Amostras de epitélio, soro e líquido vesicular, provenientes dos surtos de doenças vesiculares ocorridos no Brasil, no ano de 2015.

Estado	Município	Soro	Epitélio / Macerado*	Líquido Vesicular	Total
MG	Uberlândia	23	9	1	33
GO	Rio Verde	9	5*	-	14
	Santo Antônio da Barra	-	2		2
	Varjão	-	2		2
	Total	9	9		18
SC	Arabutã	3	2*	-	5
	Cordilheira Alta	-	1*		1
	Irani	-	2*		2
	Concórdia	-	1*		1
	Total	3	6		9

RS	Santa Rosa	11	5*	-	16
	Estrela	-	3		3
	Total	11	8		19
Total		46	32	1	79

* Macerado: epitélio submetido ao processo de maceração durante o procedimento padrão para isolamento viral utilizado no LFDA-MG

A partir dos resultados de PCR digital e em tempo real, foram selecionadas amostras dessa etapa para constituir pools a serem submetidos à metagenômica viral (item 5.4).

4.2 Isolamento Viral

O isolamento viral foi realizado em até cinco passagens cegas utilizando as seguintes células de linhagem epitelial, livres dos contaminantes propostos por Pinheiro de Oliveira et al. (2013, 2016): células de rim de suíno (*Porcine kidney cell* - PK15, ATCC® CCL-33™), células de rim de bovino (*Bovine kidney cells* - MDBK, ATCC® CCL-22™), células de rim de macaco verde (*African green monkey kidney cell line* – VERO, ATCC® CCL-81™), células de rim de hamster (*Baby hamster kidney cell* - BHK21, ATCC® CCL-10™) e em células de tumor de pulmão humano (NCI-H1299, ATCC® CRL-5803™). Aproximadamente 2 g de epitélio das amostras recebidas do surto foram maceradas com auxílio de gral e pistilo, em seguida 4 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) tratado com 1 % de solução de antibióticos e fungicidas 100 X (estreptomicina, kanamicina, L-glutamina, anfotericina B, penicilina, polimixina B) foi adicionado e o material submetido à centrifugação a 2000 g por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,45 micra e recolhido em frascos de vidro, obtendo-se o macerado. Uma quantidade de 500 µL deste macerado/inóculo foi adicionada em monocamada das células (garrafa de 25 cm²), em seguida incubada a 37 °C por 1 h em estufa com 5% de CO₂. Após esse período de incubação, foram adicionados 4,5 mL de MEM e as garrafas foram novamente incubadas em estufa com 5% de CO₂ por 72 h para visualização em microscópio invertido. Após esse período, as garrafas foram congeladas a -80 °C e descongeladas até que a monocamada fosse despreendida. Foram feitas sucessivas passagens até a visualização de algum efeito citopático. Em todo procedimento um controle de célula sem a presença de inóculo foi utilizado.

4.3 Extração de ácidos nucleicos

4.3.1 Extração de RNA

O RNA das amostras deste estudo foi extraído utilizando o kit automatizado que utiliza beads magnéticas, Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification Kits (Promega®, EUA), segundo as instruções do fabricante. Brevemente, uma quantidade de 400 µL de amostra (líquido vesicular, soro suíno e pool de soros de suíno) ou 2 g de epitélio suíno foi adicionada no poço 1 do cartucho e submetida à extração automática de RNA no equipamento Maxwell® 16 (Promega®, EUA), por 1 h. O RNA extraído foi ressuspendido em 50 µL de água livre de nucleases e estocado a - 80 °C até o momento do uso.

4.3.2 Extração de DNA

Para os vírus de DNA utilizados nos ensaios de especificidade analítica das técnicas moleculares padronizadas neste trabalho, foi também utilizado um kit automatizado de extração de DNA que contém beads magnéticas, o Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega®, EUA), segundo as instruções do fabricante. Brevemente, uma quantidade de 400 µL de amostra foi adicionada no poço 1 do cartucho e submetida à extração automática de DNA no equipamento Maxwell® 16 (Promega®, EUA), por 1 h. O DNA extraído foi ressuspendido em 50 µL de água livre de nucleases e estocado a - 20 °C até o momento do uso.

4.3.3 Extração de ácido nucleico total

Para as amostras submetidas ao sequenciamento paralelo massivo com objetivo de caracterização do viroma, foi utilizado o kit Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega®, EUA), segundo as instruções do fabricante. Brevemente, uma quantidade de 400 µL de amostra ou 2 g de epitélio foi adicionada no poço 1 do cartucho e submetida à extração automática de ácido nucléico total no equipamento Maxwell® 16 (Promega®, EUA), por 1 h. O ácido nucleico extraído foi ressuspendido em 50 µL de água livre de nucleases e estocado a - 20 °C até o momento do uso.

4.4 Transcrição reversa

O RNA extraído foi transcrito para DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), com o uso de iniciadores aleatórios, segundo as instruções do fabricante. Brevemente, dois (2) µL de RNA extraído foi adicionado em 18 µL de mix contendo 1X VILO™ Reaction

Mix, 1X SuperScript™ Enzyme Mix e DEPC-treated water q.s.p. Essa mistura foi incubada em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo de 10 min a 25 °C, em seguida 1 ciclo de 60 min a 25 °C e por último 1 ciclo de 5 min a 85 °C. O cDNA produzido foi estocado a - 20 °C até o momento do uso.

4.5 Padronização da Transcrição reversa seguida da PCR digital em gotas (RT-ddPCR)

Foram desenvolvidas e padronizadas neste trabalho, RT-ddPCRs para o vírus da Febre Aftosa (FMDV) em *two-step* e para o *Senecavirus A* (SVA) em *one-step* e *two-step*. A RT-ddPCR para o FMDV foi padronizada inicialmente, por não haver, entre 2015-2016, nenhum isolado do SVA a partir de amostras do presente trabalho e porque não houve como obtê-lo em nenhuma Instituição Pública ou Privada. Os testes realizados nessa etapa de padronização das RT-ddPCR foram feitos em paralelo com a PCR em tempo real (RT-qPCR) a fim de comparar a sensibilidade e especificidade entre as técnicas.

4.5.1 Oligonucleotídeos

A tabela 4 apresenta os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Os oligonucleotídeos para *b-actina* foram utilizados na PCR em tempo real para esse alvo com o objetivo de avaliar a eficiência da extração de ácidos nucleicos das amostras biológicas.

O software Primer 3 plus (Untergassen et al., 2012) foi utilizado para desenhar os oligonucleotídeos do SVA. O Primer-Blast (Ye et al., 2012) e o OligoAnalyzer 3.1 (IDT, Iowa, USA) foram utilizados para análises *in silico* como alinhamento, análise da presença de estruturas secundárias (*self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*), temperatura de *melting* e especificidade analítica dos *primers*. Os primeiros ensaios foram realizados com a sonda contendo um *quencher*. No entanto, a sonda foi alterada para duplo *quencher* contendo o ZEN™ (Tabela 4).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados no estudo, sequência, região e referência

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Região	Referência
vírus da Febre Aftosa (<i>Foot-and-mouth disease virus</i> - FMDV)	F: ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA R: GCGAGTCCTGCCACGGA Sonda: FAM-TCCTT TGCA-ZEM-CGCCGT GGGAC-3IBKFQ	3D	Callahan et al. (2002)
<i>Senecavirus A</i>	F: TAGATTGATGCACCCCTTCG R:-AACAAGGCCCTCCATCTTG Sonda: /56-FAM/CCG TAC CGA /ZEN/ GTC ACG AGT ACC TGC A /	3D	Presente estudo

	3IABkFQ/		
Beta-actina	F: AACCAAGTTCGCCATGGAT R: TGCCGGAGCCGTTGT Sonda: Cy5- TGATATTGCTGCGCTCGTGGTC- BHQ3	Beta-actina	Bielanski et al. (2009)

4.5.2 Determinando a temperatura ótima de anelamento / extensão

O gradiente de temperatura de 54 a 60 °C (intervalo de 1 ou de 2 graus) foi realizado a fim de definir a melhor temperatura de anelamento / extensão das RT-ddPCRs. Foram utilizados, nesta etapa, diferentes concentrações de plasmídeo como controle positivo e mix contendo os reagentes da reação, exceto RNA ou DNA, como controle negativo (NTC – *no template control*).

4.5.3 Condições de amplificação

As condições de amplificação das RT-ddPCRs estão descritas na tabela 5. Essa tabela apresenta também as condições de amplificação das RT-qPCRs. Em todas as reações, foram adicionados 2 µL de RNA ou cDNA ou DNA ou ácido nucleico total.

Tabela 5 – Condições de amplificação das técnicas moleculares utilizadas neste estudo

Técnicas moleculares	Reação	Equipamento e condições de ciclagem
RT-ddPCR two-step (FMDV)	10 µL de ddPCR Super mix para sondas, 2,16 µL de primers forward e reverse (ambos 10 pmol/µL), 0,6 µL de sonda (10 pmol/µL) e 7,08 µL de H ₂ O livre de RNase/ DNase.	Px2 Thermal Cyclers (Thermo Electron Corporation, USA) 1 cycle: 95 °C – 10' 40 cycles: 94 °C – 30'' 58 °C – 1' 1 cycle: 98 °C – 10'
RT-ddPCR one-step (SVA)	6 µL de ddPCR Super mix para sondas, 2,4 µL de transcriptase reversa, 1,2 µL de DTT - Dithiothreitol (300 mM), 2,16 µL de primers forward e reverse (ambos 10 pmol/µL), 0,6 µL de sonda (10 pmol/µL) e 4.48 µL de H ₂ O livre de RNase/ DNase.	Px2 Thermal Cyclers (Thermo Electron Corporation, USA) 1 cycle: 42 °C – 60' 1 cycle: 95 °C – 10' 40 cycles: 95 °C – 30'' 59 °C – 1' 1 cycle: 98 °C – 10'

RT-ddPCR <i>two-step</i> (SVA)	10 µL de ddPCR Super mix para sondas, 2,16 µL de primers forward e reverse (ambos 10 pmol/µL), 0,6 µL de sonda (10 pmol/µL) e 7.08 µL de H ₂ O livre de RNase/ DNase.	Px2 Thermal Cyclers (Thermo Electron Corporation, USA) 1 cycle: 95 °C – 10' 40 cycles: 94 °C – 30'' 56 °C – 1' 1 cycle: 98 °C – 10'
RT-qPCR <i>two-step</i> (FMDV)	12.5 µL de 2X Quantifast Probe RT-PCR mix (Qiagen, USA), 2 µL de primers forward e reverse (ambos 10 pmol/µL), 0,5 µL de sonda (10 pmol/µL) e 5 µL de H ₂ O livre de RNase/ DNase.	CFx96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cyclers (BIO-RAD, USA) 1 cycle: 50 °C – 10' 1 cycle: 95 °C – 5' 45 cycles: 95 °C – 10'' 60 °C – 60'
RT-qPCR <i>one-step</i> (SVA) *	12.5 µL de 2X Quantifast Probe RT-PCR mix (Qiagen, USA), 1 µL de primers forward e reverse (ambos 10 pmol/µL), 0,75 µL de sonda (10 pmol/µL), 0,25 µL de Quantifast RT reverse transcriptase e 3 µL de H ₂ O livre de RNase/ DNase.	CFx96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cyclers (BIO-RAD, USA) 1 cycle: 50 °C – 10' 1 cycle: 95 °C – 5' 45 cycles: 95 °C – 10'' 60 °C – 60'

* Para a RT-qPCR em *two step*, o Quantifast RT reverse transcriptase não foi utilizado e 0,25 µL de H₂O livre de RNase/ DNase foi adicionado. As demais condições como equipamento e temperatura foram as mesmas da reação em *one step*.

Para as RT-ddPCRs, 20 µL da reação de PCR foram transferidos para um cartucho de 8 canais e em seguida, setenta (70) microlitros de óleo, responsável pela geração de gotas, foram acrescentados nos poços adjacentes (BIO-RAD, EUA). Esse cartucho foi colocado no gerador de gotas QX200 (BIO-RAD, EUA) com o objetivo de particionar cada amostra em 20.000 gotas. O material genético foi distribuído aleatoriamente nas gotas durante o processo de partição.

Após a partição, as gotas geradas foram transferidas para a placa *semi-skirted 96-well PCR plate* (Eppendorf, Alemanha) e essa placa foi selada e submetida à amplificação, conforme condições descritas na tabela 5. Após a amplificação do material genético dentro das gotas, a placa foi inserida no leitor QX200 *droplet reader* (BIO-RAD, EUA) para análise / quantificação absoluta das gotas positivas e negativas para os alvos estudados.

O software QuantaSoft 1.6 foi utilizado para visualizar os dados de amplitude 1D, concentração, números de cópias e de eventos (número de gotas positivas, negativas e totais).

Um threshold “multi-well” foi utilizado em todos os poços de acordo com os resultados de especificidade em amostras negativas para discriminar entre gotas negativas e positivas. O software reportou automaticamente o número de cópias de cada amostra.

4.5.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi realizada utilizando diluições seriadas (10^{-1} to 10^{-8}) do FMDV (amostra A24 Cruzeiro – $10^{6,4}$ TCID₅₀/mL) ou do SVA, isolado de Uberlândia, Minas Gerais ($10^{6,87}$ TCID₅₀/mL). Além disso, foi utilizado, para determinação do limite de detecção, o plasmídeo pUCIDT Kan-FMDV (1 ng/ μ L) (IDT, Iowa, USA) ou plasmídeo pUCIDT Kan-SVA (0,02 ng/ μ L) (IDT, Iowa, USA) contendo gene de resistência à kanamicina com inserção do gene codificador da proteína não estrutural 3D (FMDV ou SVA) linearizado por restrição enzimática com a enzima *HpHI* ou circularizado.

4.5.5 Especificidade analítica

A especificidade analítica foi avaliada com o uso do material genético proveniente de dezesseis (16) vírus causadores de enfermidades vesiculares, sendo 12 vírus de RNA e 4 de DNA (Tabela 6). Esses materiais genéticos foram amplificados previamente nas PCRs para cada vírus, conforme protocolo descrito por Callahan et al. (2002) (*Foot-and-mouth disease virus*); Oliveira et al. (2018) (*Alagoas vesiculovirus* e *Cocal vesiculovirus*); Rodriguez et al. (1993) (*Indiana vesiculovirus* e *New Jersey vesiculovirus*); Hofman et al. (2008) (*Buetongue virus*); Ridpath; Bolin (1998) (*Bovine viral diarrhea virus 1*); Wang et al. (2007) (*Bovine alphaherpesvirus 1*); Laguardia-Nascimento et al. (2017) (*Pseudocowpox virus* e *Vaccinia virus*) e Pinheiro de Oliveira et al. 2015 (*Ungulate protoparvovirus 1*).

Tabela 6 - Vírus de RNA e DNA utilizados na especificidade analítica das RT-ddPCR

Vírus de RNA (8 espécies)	Gênero	Subfamília	Família
e de DNA (4 espécies)			
<i>Senecavirus A</i>	<i>Senecavirus</i>		<i>Picornaviridae</i>
<i>Foot-and-mouth disease virus</i> (três sorotipos: O1 Campos, A24 Cruzeiro and C3 Indaial)	<i>Aphthovirus</i>		<i>Picornaviridae</i>
<i>Alagoas vesiculovirus</i> (três amostras)	<i>Vesiculovirus</i>		<i>Rhabdoviridae</i>
<i>Cocal vesiculovirus</i>	<i>Vesiculovirus</i>		
<i>Indiana vesiculovirus</i>	<i>Vesiculovirus</i>		
<i>New Jersey vesiculovirus</i>	<i>Vesiculovirus</i>		
<i>Buetongue virus</i>	<i>Orbivirus</i>	<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Reoviridae</i>

<i>Bovine viral diarrhea virus 1</i>	<i>Pestivirus</i>		<i>Flaviviridae</i>
<i>Bovine alphaherpesvirus 1</i>	<i>Varicellovirus</i>	<i>Aphaerpesvirinae</i>	<i>Herpesviridae</i>
<i>Pseudocowpox virus</i>	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Poxviridae</i>
<i>Vaccinia virus</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Poxviridae</i>
<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	<i>Protoparvovirus</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvoviridae</i>

4.5.6 Especificidade diagnóstica

A especificidade diagnóstica foi avaliada com o uso de 50 amostras de epitélio bovino ou líquido esofágico-faríngeo (RT-ddPCR para FMDV) ou 50 amostras de epitélio suíno (RT-ddPCR para SVA) negativas para FMDV, *Senecavirus A* e outros vírus causadores de enfermidades vesiculares em bovinos ou suínos, dependendo da matriz utilizada. Essas amostras foram recebidas pelo LFDA-MG, localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

Na RT-ddPCR para FMDV, foram ainda utilizadas dez (10) amostras positivas (epitélio) de bovinos do último surto ocorrido no Brasil, em 2005, no estado do Mato Grosso do Sul. Essas amostras foram caracterizadas pelo sequenciamento da região codificadora da VP1 do FMDV sorotipo O (Malirat *et al.*, 2007).

4.6 Uso da RT-ddPCR para detecção e quantificação do SVA

A RT-ddPCR para o SVA, foi utilizada nas amostras descritas no item 4.1, com o objetivo de detectar e quantificar o número de moléculas alvo do SVA a partir do RNA extraído. Algumas amostras detectadas foram sequenciadas, de acordo com Laguardia-Nascimento (2016). Essas amostras foram ainda submetidas à RT-qPCR, a fim de estabelecer uma correlação entre as técnicas utilizando a estatística Kappa (Kundel; Polansky, 2003).

4.7 Amostras selecionadas para metagenômica viral

Com base nos resultados dos ensaios realizados no item 4.6, algumas amostras positivas e negativas para o SVA foram selecionadas para dar seguimento aos ensaios de metagenômica viral. Foram feitos *pools* por estado e tipo de amostra (epitélio e soro), a fim de contemplar os estados envolvidos no surto e também o tipo de amostra recebida. Além disso, como critério de escolha das amostras, foram utilizadas amostras (positivas e negativas) com resultados prévios por meio da PCR digital padronizada nesta tese para o SVA para compor os *pools*.

4.8 Metagenômica viral

As amostras selecionadas foram submetidas novamente à extração de ácido nucleico total, conforme descrito no item 4.3.3 da seção Material e Métodos. Em seguida, o material genético extraído foi tratado com DNase, utilizando o kit Turbo Dnase (Ambion® Thermo Fisher Scientific, EUA) conforme instruções do fabricante.

O cDNA de fita simples resultante foi submetido então a construção de *pools* equimolares por estado e tipo de amostra e enviado para Síntese Biotecnologia (Minas Gerais, Brasil) que em parceria com a Omega Bio-tek (Norcross, GA), realizaram as posteriores etapas, conforme item 4.8.1.

4.8.1 Construção e sequenciamento das bibliotecas

A segunda fita de cDNA foi sintetizada pela adição de 20 µL do reagente *Second Strand Marking Master Mix*, presente no kit *Truseq Stranded mRNA library* (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA) e incubado a 16°C por 1 hora. O cDNA de fita dupla foi purificado utilizando beads magnéticas (*Mag-Bind RxnPure Plus magnetic beads mix*) (Omega Bio-tek, Norcross, GA) e em seguida utilizado para construção de bibliotecas pelo Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

O cDNA foi fragmentado utilizando 10 µL do tampão de fragmentação TD (*Tagment DNA Buffer*), 5 µL de cDNA e 5 µL do ATM (*Amplicon Tagment Mix*) diluído (reação de 20 µL). Essa reação foi incubada a 55 °C por 5 min e em seguida submetida à amplificação nas seguintes condições de tempo e temperatura: 72 °C por 3 min e 95 °C por 30 s (etapa inicial de desnaturação), seguida de 12 ciclos de 95°C por 10 s (desnaturação), 55 °C por 30 s (anelamento) e 72°C por 30 s (extensão) e um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min.

As bibliotecas amplificadas foram purificadas com 1,6 x do volume de *Ampure XP beads* e eluídas em 20 µL de tampão e em seguida avaliadas quanto à quantidade e qualidade utilizando o instrumento Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As amostras foram então submetidas a *pools* com concentrações equimolares e sequenciadas no HiSeq 2500.

4.8.2 Análise dos dados obtidos

Os dados brutos foram processados no Sagarana HPC e na plataforma Galaxy (Afgan et al., 2016). Foi utilizado o programa MetLab (Norling et al., 2016) que contém algoritmos

implementados na linguagem Python e *pipelines* para o controle de qualidade das sequências das *reads* (dados brutos), retirada dos adaptadores e índice (trimagem), eliminação do DNA do hospedeiro, montagem dos contigs, alinhamento com banco de dados e classificação taxonômica (figura 12)

Um filtro de valor de 20 de phred score foi utilizado na primeira etapa do pipeline realizada pelo PRINSEQ para avaliar as sequências brutas. Além disso, foi adicionado um filtro de 150 pb nas sequências montadas para posterior classificação e comparação do número de fragmentos classificados por tamanho acima ou abaixo desse filtro. Esse ponto de corte foi definido baseado em um tamanho que permita assegurar a confiabilidade de uma proteína (30 aa) ou ainda capaz de ser confirmado por sequenciamento. Os contigs correspondentes aos vírus encontrados foram avaliados quanto ao tamanho, cobertura, identidade e similaridade usando o Blast+ (Camacho et al., 2009) e o Blast (NCBI).

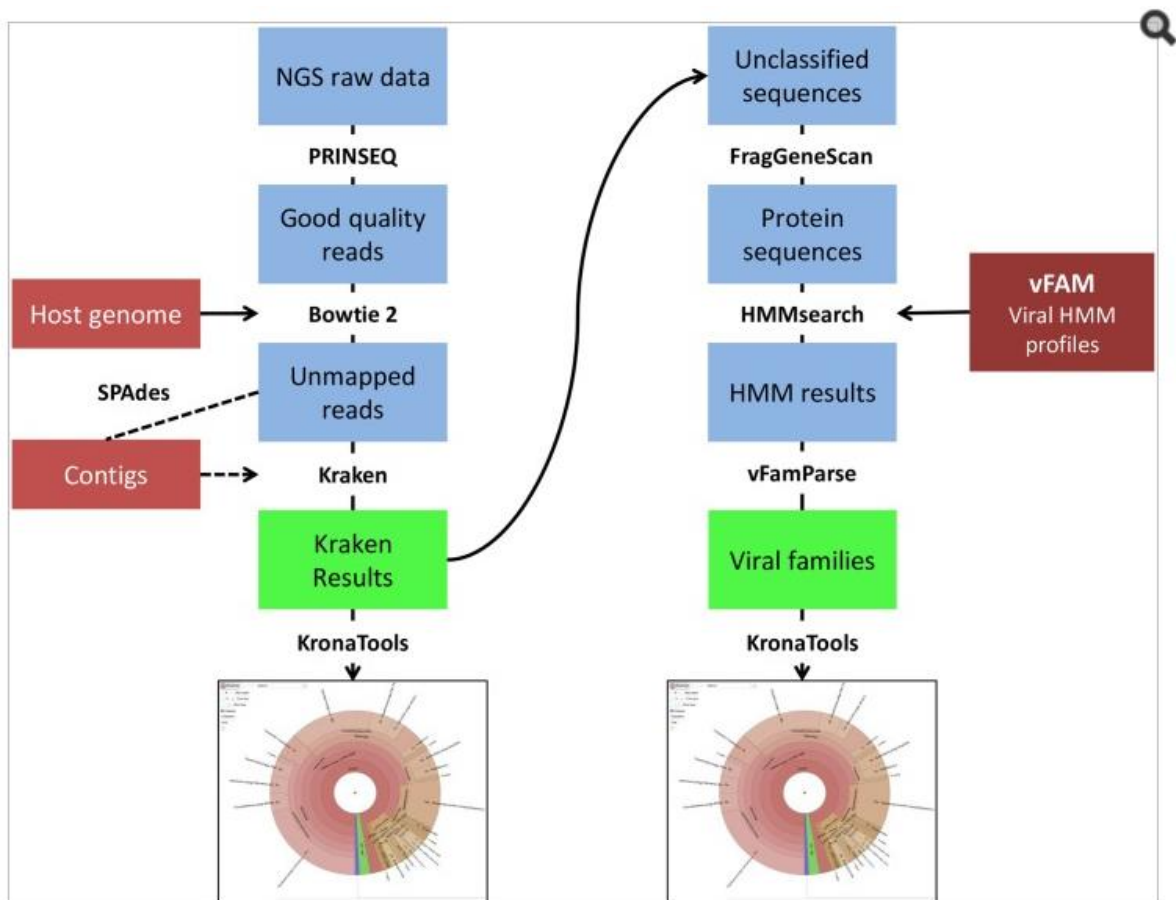


Figura 12 - Esquema simplificado de funcionamento do programa MetLab (Norling et al., 2016).

4.9 Inferências filogenéticas

O alinhamento da sequência do maior contig da amostra 03 (epitélio SC) foi realizado frente a 117 sequências do genoma completo do SVA de diferentes países e anos como Estados Unidos, Canadá, Vietnã, Colômbia, China, Brasil e Tailândia utilizando o Clustal W disponível no Mega7.0.26. O programa Tree-Puzzle (SCHMIDT et al., 2002) foi utilizado para realizar a análise do sinal filogenético das sequências de nucleotídeo do SVA convertidas do formato FASTA para o formato PHYLIP (.phy).

A análise de saturação foi realizada pelo software Dambe7 (Xia, 2018) nas sequências do maior contig da amostra 03 com outras 117 do genoma completo do *Senecavirus A* mencionadas no item 4.9.1. Essas sequências estavam disponíveis no Genbank e foram utilizadas a fim de se obter, por meio de plotagem, o número de transições e transversões observadas versus a distância genética corrigida por um modelo de evolução, o que permite uma posterior reconstrução filogenética acurada.

O programa MEGA 7.0.26 (Kumar et al., 2016) foi utilizado para escolha do melhor modelo de substituição a ser utilizado na reconstrução das árvores filogenéticas nas sequências desse trabalho. Após a etapa de escolha do melhor modelo, a árvore filogenética foi reconstruída utilizando o método da máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e com 1000 réplicas de boot strap.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento Viral

Nenhum efeito citopático foi visualizado nas células PK15, VERO, BHK21 e MDBK após cinco passagens cegas a partir do material coletado nos surtos, e, com a metodologia descrita. O *Senecavirus A* somente foi isolado, quando células de tumor de pulmão humano (NCI-H1299) foram utilizadas, e, após sucessivas passagens (até cinco passagens). O efeito citopático foi caracterizado pela presença de células arredondadas, projeção citoplasmática e refringência das células. O isolamento ocorreu a partir de amostras de epitélio de suíno pertencentes ao surto ocorrido no Brasil em 2015, provenientes de Uberlândia, Minas Gerais (Figuras 13 e 14), Santa Rosa (Rio Grande do Sul) e Santo Antônio da Barra (Goiás). A região gênica parcial codificadora da VP1 correspondente ao isolado de Minas Gerais foi sequenciada obtendo o número de acesso KT007135 no *GenBank* (NCBI) (Laguardia-Nascimento et al., 2016).

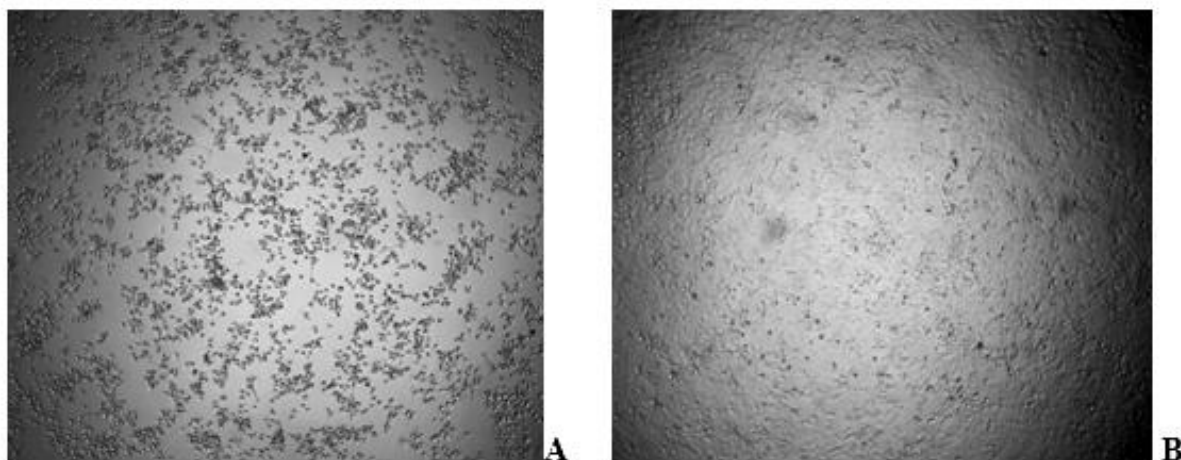


Figura 13 - Isolamento do SVA em aumento de 40x. **(A)** Senecavirus A isolado em célula NCI-H1299. **(B)** Controle celular não infectado.

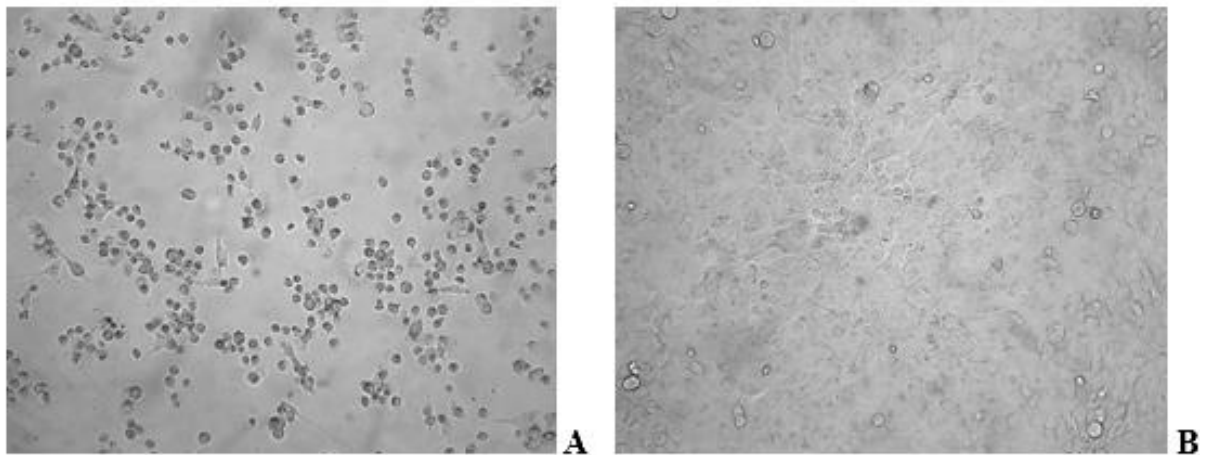


Figura 14 - Isolamento do SVA em aumento de 100x. (A) Senecavirus A isolado em célula NCI-H1299. (B) Controle celular não infectado.

5.2 Padronização da Transcrição reversa seguida da PCR digital em gotas (RT-ddPCR)

5.2.1 Oligonucleotídeos

Os primeiros resultados da padronização da RT-ddPCR para *Senecavirus A* (*one-step*) referem-se à alteração da sonda de marcação única (*single-quenched probe*) para marcação dupla (*double-quenched probe*), contendo além do fluoróforo na extremidade 5' da sonda, outro fluoróforo, o ZENTM, entre o fluoróforo e o quencher. Essa sonda de marcação dupla foi o mesmo tipo de marcação já utilizada para FMDV no LFDA-MG. A sonda de duplo *quencher* permitiu melhor separação entre as gotas negativas e positivas e menor sinal de *background* das gotas negativas (Figura 15).

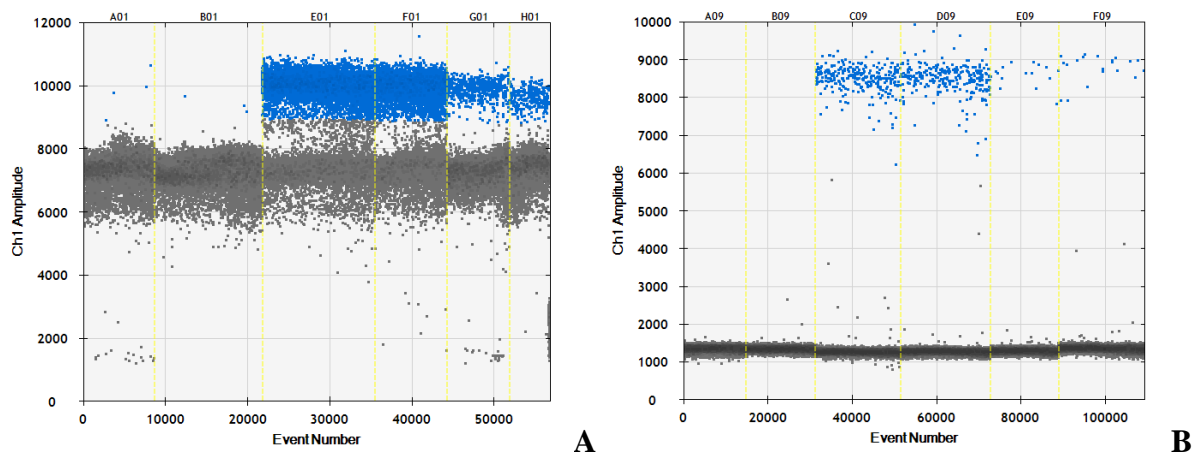


Figura 15 – RT-ddPCR *one-step* para SVA utilizando sonda com único quencher (A) e com duplo quencher (B)

(A) Reação com sonda de único quencher. A01-B01: controle negativo (no template control-NTC). E01-F01: plasmídeo contendo o gene 3D do SVA 10^{-3} . G01-H01: plasmídeo contendo o gene 3D do SVA 10^{-4} . (B) Reação com sonda de duplo quencher. A09-B09: controle negativo (NTC). C09-D09: plasmídeo contendo o gene 3D do SVA 10^{-3} . E09-F09: plasmídeo contendo o gene 3D do SVA 10^{-4} . O eixo x representa o número de eventos (gotas geradas) e o eixo y, o sinal de fluorescência em amplitude, no canal 1 do equipamento. Em azul, gotas positivas e em cinza gotas negativas.

5.2.2 Determinando a temperatura ótima de anelamento / extensão

As temperaturas de 58 °C, 59 °C e 56 °C forneceram melhor separação entre as gotas positivas e negativas nas RT-ddPCR para FMDV, SVA (*one-step*) e SVA (*two-step*), respectivamente. Além disso, essas temperaturas foram as únicas que permitiram, dentro do gradiente avaliado, um número total de gotas acima de 12.000, o qual é requerido para determinação da quantificação absoluta.

5.2.3 Sensibilidade analítica

As PCRs em passo único foram consideradas mais sensíveis que as realizadas em dois passos. Quando comparadas PCR digital (RT-ddPCR) em *two-step* com a tempo real (RT-qPCR) em *two-step* ou RT-ddPCR *one-step* com RT-qPCR *one-step*, os resultados de limite de detecção foram os mesmos (tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da sensibilidade analítica das técnicas RT-ddPCR e RT-qPCR na detecção dos vírus FMDV e SVA

Alvo	Técnicas moleculares	Limite de detecção	
		Vírus isolado	Plasmídeo
Foot-and-mouth disease virus - FMDV	RT-ddPCR <i>two-step</i>	até 1,00 TCID ₅₀	* até 2 fg
	RT-qPCR <i>two-step</i>	até 1,00 TCID ₅₀	* até 2 fg
Senecavirus A – SVA	RT-ddPCR <i>one-step</i>	até 0,185 TCID ₅₀	até 0,1 fg
	RT-ddPCR <i>two-step</i>	até 1,85 TCID ₅₀	até 4 fg
	RT-qPCR <i>one-step</i>	até 0,185 TCID ₅₀	até 0,1 fg
	RT-qPCR <i>two-step</i>	até 1,85 TCID ₅₀	até 4 fg

* mesmo resultado quando utilizado plasmídeo linearizado ou circularizado

A figura 16 apresenta o limite de detecção das técnicas moleculares para FMDV.

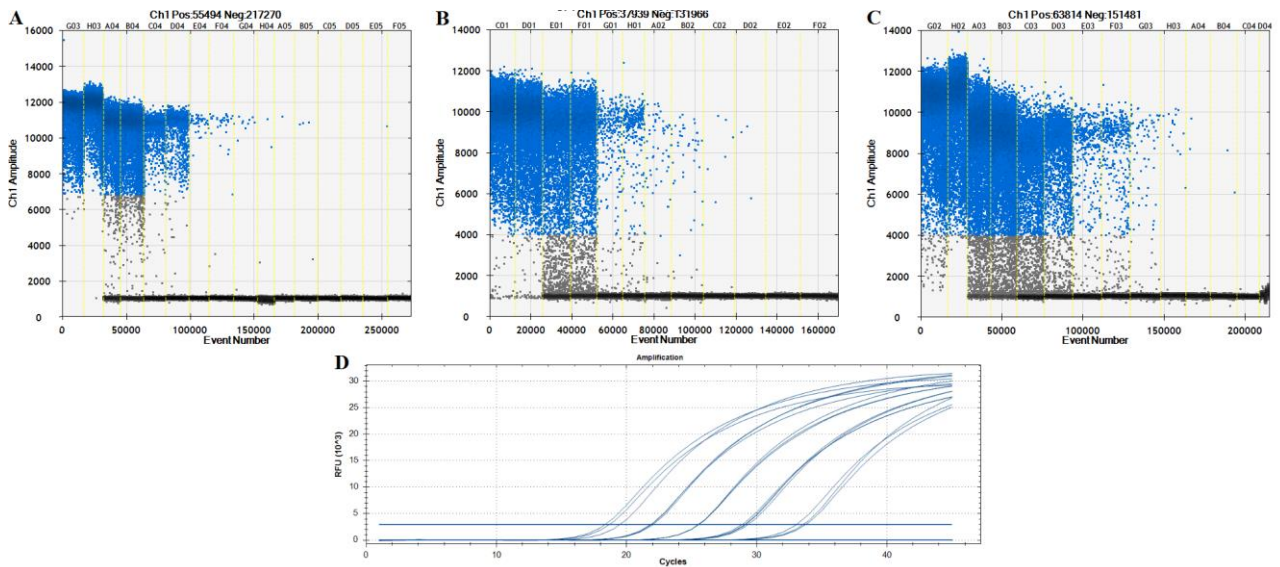
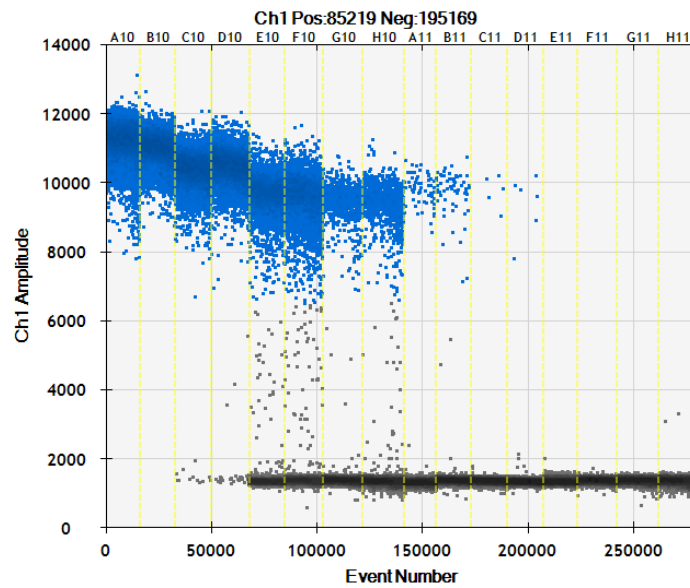
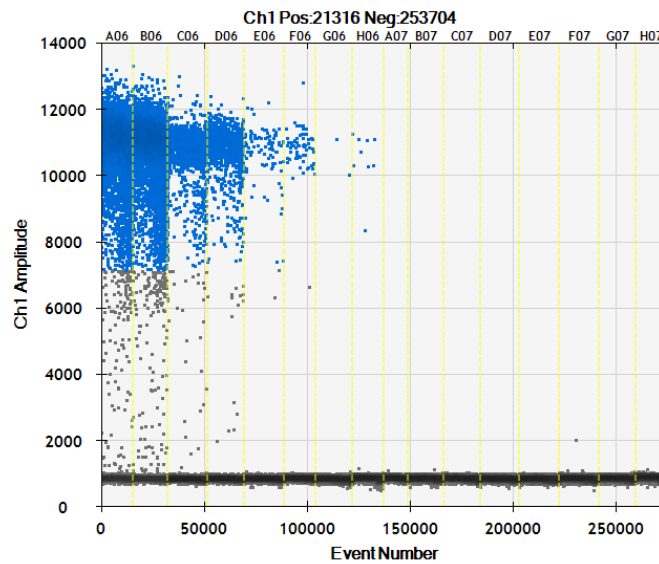


Figura 16 – Limite de detecção das técnicas moleculares para detecção do FMDV (A) Limite de detecção da RT-ddPCR a partir de diluições seriadas do FMDV A24 Cruzeiro (10^{6.4} TCID₅₀/mL). G3-H3: diluição de 10⁻¹. A4-B4: diluição de 10⁻². C4- D4: diluição de 10⁻³. E4-F4: diluição de 10⁻⁴. G4-H4: diluição de 10⁻⁵. A5-B5: diluição de 10⁻⁶. C5-D5: diluição de 10⁻⁷. E5-F5: diluição de 10⁻⁸. (B) Limite de detecção da RT-ddPCR a partir de diluições seriadas do plasmídeo linearizado. C1-D1: diluição de 10⁻³; E1-F1: diluição de 10⁻⁴; G1-H1: diluição de 10⁻⁵; A2-B2: diluição de 10⁻⁶; C2-D2: diluição de 10⁻⁷; E2-F2: diluição de 10⁻⁸. (C) Limite de detecção da RT-ddPCR a partir de diluições seriadas do plasmídeo circularizado. G2-H2: diluição de 10⁻²; A3-B3: diluição de 10⁻³; C3-D3: diluição de 10⁻⁴; E3-F3: diluição de 10⁻⁵; G3-H3: diluição de 10⁻⁶; A4-B4: diluição de 10⁻⁷; C4-D4: diluição de 10⁻⁸. (D) Limite de detecção da RT-qPCR a partir de diluições seriadas, em triplicatas, (10⁻¹ to 10⁻⁸) do FMDV A24 Cruzeiro (10^{6.4} TCID₅₀/mL). Esta figura apresenta a curva de amplificação das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁵ (triplicatas). Figuras A B e C: Em azul, gotas positivas e em cinza gotas negativas.

A figura 17 apresenta o limite A24 Cruzeiro de detecção das RT-ddPCR *one-step* (A) e *two-step* para SVA utilizando diluições seriadas do plasmídeo circularizado.



A



B

Figura 17 - Limite de detecção das RT-ddPCR *one-step* e *two-step* para detecção do SVA (**A**) Limite de detecção da RT-ddPCR *one-step* a partir de diluições seriadas do plasmídeo contendo o gene 3D do SVA (0,02 ng / μ L). A10-B10: diluição de 10^{-1} . C10-D10: diluição de 10^{-2} . E10-F10: diluição de 10^{-3} . G10-H10: diluição de 10^{-4} . A11-B11: diluição de 10^{-5} . C11-D11: diluição de 10^{-6} . E11-F11: diluição de 10^{-7} . G11-H11: diluição de 10^{-8} . (**B**) Limite de detecção da RT-ddPCR *two-step* a partir de diluições seriadas do plasmídeo circularizado contendo o gene 3D do SVA (0,02 ng / μ L). A6-B6: diluição de 10^{-1} . C6-D6: diluição de 10^{-2} . E6-F6: diluição de 10^{-3} . G6-H6: diluição de 10^{-4} . A7-B7: diluição de 10^{-5} . C7-D7: diluição de

10⁻⁶. E7-F7: diluição de 10⁻⁷. G7-H7: diluição de 10⁻⁸. Em azul, gotas positivas e em cinza, gotas negativas.

5.2.4 Especificidade analítica

A RT-ddPCR para FMDV e SVA (*one-step* e *two-step*) amplificaram somente os alvos, não havendo detecção de nenhum dos outros vírus diferenciais (mencionados no item 4.5.5 da seção Materiais e Métodos). No caso da RT-ddPCR para FMDV, os três sorotipos brasileiros do FMDV (A24 Cruzeiro, O1 Campos e C3 Indaial) foram amplificados.

Os resultados da especificidade analítica da RT-ddPCR para FMDV foram os mesmos encontrados na RT-qPCR para FMDV. Entretanto, no que se refere à especificidade analítica da RT-qPCR para SVA, o DNA de *Vaccinia virus* foi detectado com CT de 38,29 no ensaio em *one-step* e o RNA do *Alagoas vesiculovirus* – amostra Agulhas Negras, na reação *two-step* (CT de 38,23). Essas amplificações foram confirmadas em triplicata, ainda que os CT's apresentados tenham sido altos.

5.2.5 Especificidade diagnóstica

A RT-qPCR para beta-actina amplificou todas as amostras utilizadas neste estudo. Além disso, para o *Senecavirus A* (SVA), somente foram utilizadas nesta etapa os ensaios em *one-step* da RT-ddPCR e RT-qPCR, por apresentarem os melhores resultados de sensibilidade e especificidade analítica.

As RT-ddPCRs não amplificaram nenhuma das 50 amostras de suíno negativas para SVA ou nenhuma das 50 amostras de bovino negativas para FMDV avaliadas. Além disso, quando a RT-ddPCR para SVA foi utilizada na testagem dessas amostras, 8 das 50 amostras de suíno (16 %) geraram uma gota na amplitude de aproximadamente 4000-6500, o que permitiu definir o threshold ou cut-off como sendo a amplitude de 6500 para definir as gotas como sendo positivas (figura 18). Na RT-ddPCR para FMDV, 11 das 50 amostras de bovino negativas (22 %) geraram uma gota na amplitude de aproximadamente 2000-4000, sendo considerado como cut-off a amplitude de aproximadamente 4000, determinada de forma manual no aparelho.

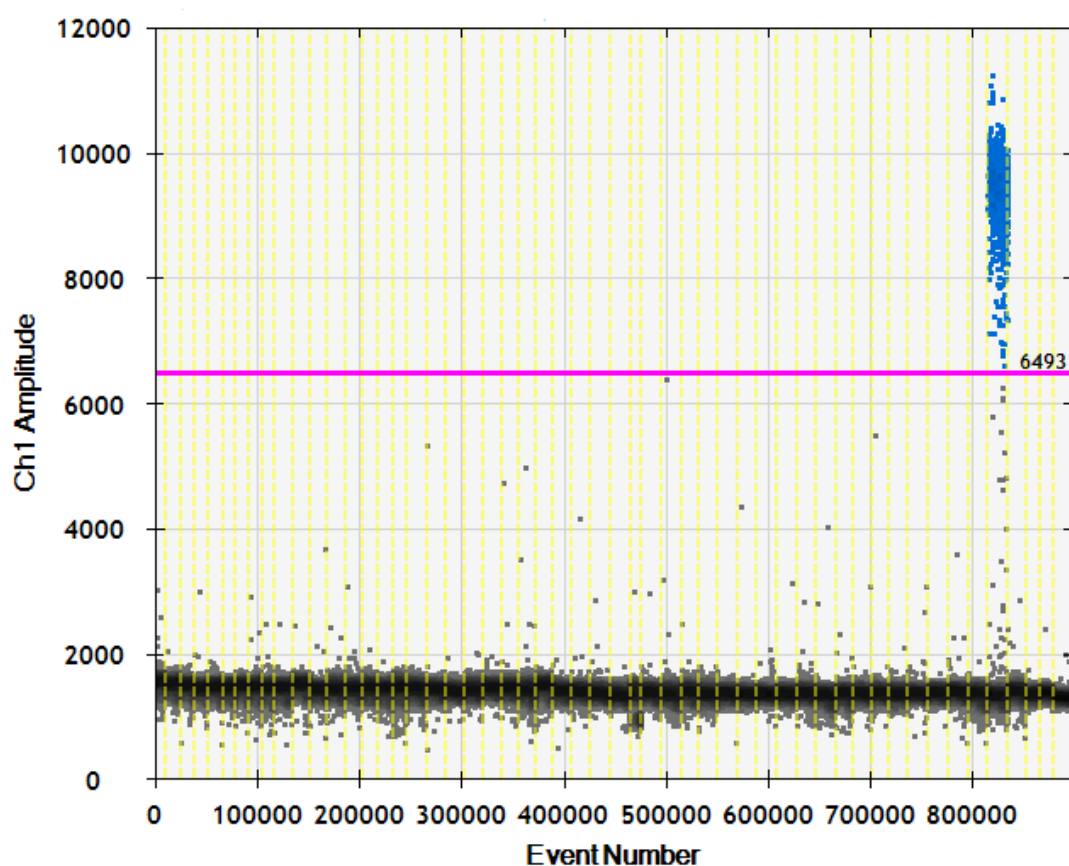


Figura 18 – RT-ddPCR *one step* para SVA em amostras de suíno negativas (ensaio de especificidade analítica). Somente o controle positivo foi amplificado e oito (8) das 50 (16 %) das amostras negativas geraram uma gota na amplitude entre 4000-6500. O eixo x representa o número de eventos (gotas geradas) e o eixo y, o sinal de fluorescência em amplitude, no canal 1 do equipamento. Em azul, gotas positivas e em cinza gotas negativas. Linha rosa: *threshold*.

A RT-ddPCR para FMDV amplificou as 10 amostras positivas (Figura 19), as quais foram quantificadas de forma absoluta (cDNA) (figura 20) e tiveram a correlação com o número de cópias de RNA no *template* utilizado (Tabela 8). Os mesmos resultados foram encontrados quando utilizada a RT-qPCR avaliando-se as mesmas amostras. A figura 21 apresenta o número de eventos (gotas positivas e negativas) de cada amostra positiva do último surto brasileiro de febre aftosa, o qual ocorreu no Mato do Grosso do Sul em 2005.

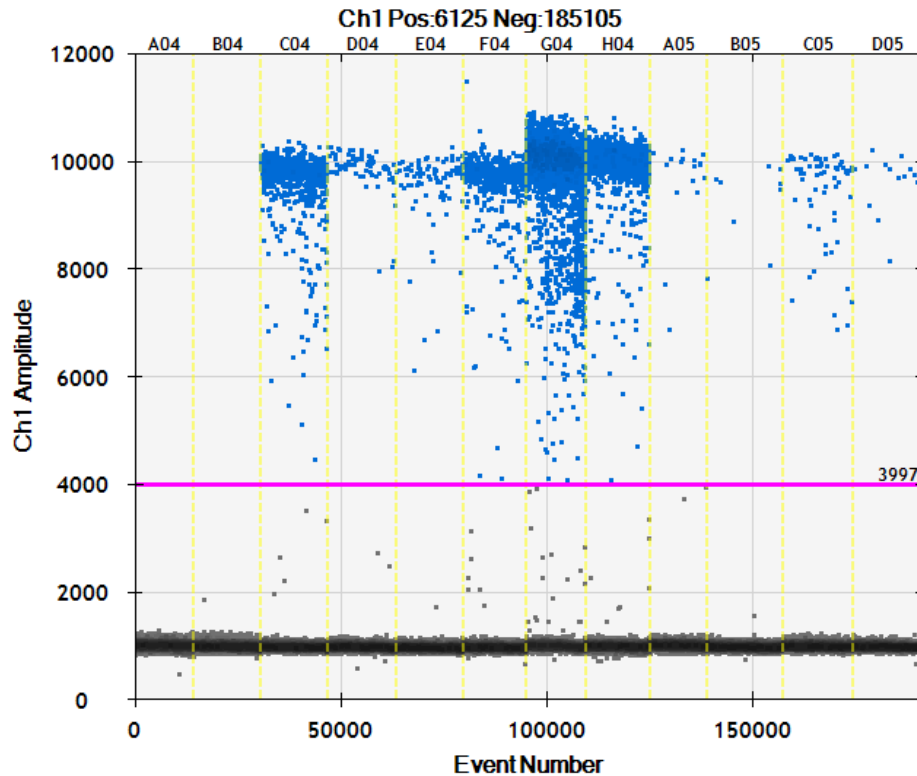


Figura 19 - RT-ddPCR para FMDV nas amostras positivas do último surto ocorrido no Brasil, em 2005, no Mato Grosso do Sul. A04-B04: Controle negativo (No-Template Control); C04-D05: cDNA das amostras positivas do último surto ocorrido no Brasil. O eixo x representa o número de eventos (gotas geradas) e o eixo y, o sinal de fluorescência em amplitude, no canal 1 do equipamento. Em azul, gotas positivas e em cinza gotas negativas. *Linha rosa*: threshold.

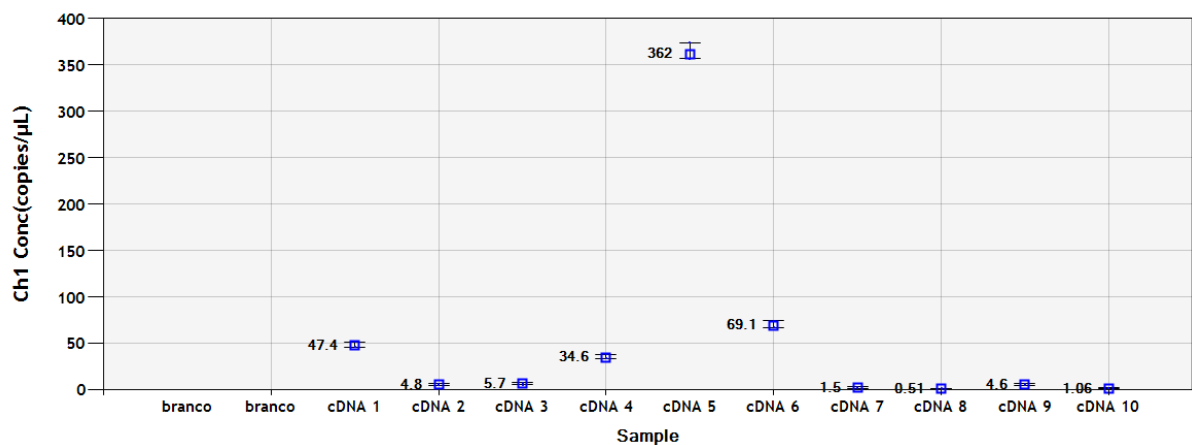


Figura 20 – Número de cópias/ μL de cada amostra positiva testada (cDNA) pela RT-ddPCR para FMDV do último surto ocorrido no Mato Grosso do Sul.

Tabela 8 - Número de cópias de RNA detectadas em cada amostra positiva do último surto de Febre Aftosa no Brasil

Amostra	Concentração de RNA (Cópias /20 µL)
01	948
02	96
03	114
04	698
05	7300
06	1390
07	30
08	10,2
09	92
10	21,2

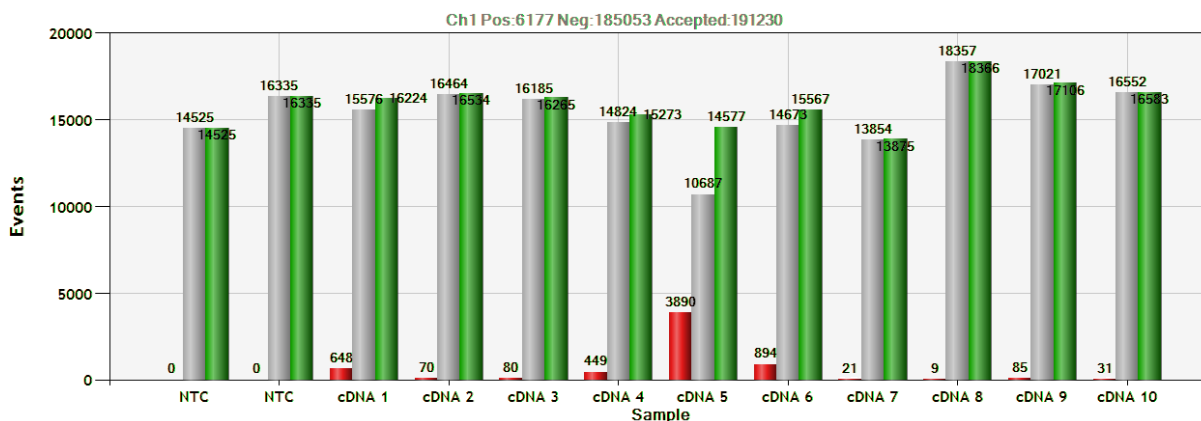


Figura 21 - PCR digital do SVA: Número de eventos (gotas positivas, negativas e totais) para cada amostra positiva. As barras vermelhas apresentam as gotas positivas, as cinzas mostram as gotas negativas e as verdes representam as gotas totais. NTC: no template control. cDNA 1 – 10: amostras positivas do último surto de febre aftosa ocorrido no Brasil (2005).

5.3 Uso da RT-ddPCR para a detecção e quantificação do SVA nas amostras biológicas provenientes dos surtos de doenças vesiculares

A RT-ddPCR e a RT-qPCR para o SVA realizadas em sistema *one-step* mostraram-se mais sensíveis e específicas e, portanto, foram utilizadas para testar as amostras biológicas provenientes dos surtos de doenças vesiculares descritas no item 4.1. Quando avaliadas as amostras de *pool* de soros (total de 147), o RNA do SVA foi detectado em três (3) *pools*, (pertencentes aos estados de Goiás, Santa Catarina e Minas Gerais) pela RT-ddPCR (*one-step*). Em dois desses três *pools*, o SVA foi detectado também por RT-qPCR (Santa Catarina – CT: 34,63 and Goiás – CT: 35,10). A quantidade de cópias de RNA de SVA por microlitro

de cada amostra quantificada pela RT-ddPCR foi de 607 cópias/ μL (GO), 326 cópias/ μL (SC) e 34 cópias/ μL (MG).

O SVA foi detectado em vinte e sete (27) das 79 amostras testadas pelos ensaios em *one-step* (34,17 %). No entanto, houve uma amostra discordante, onde o SVA foi detectado em uma amostra de epitélio de suíno de GO na RT-qPCR, mas não na RT-ddPCR. O mesmo ocorreu de maneira inversa, na RT-ddPCR que detectou o SVA em um soro sanguíneo de Santa Catarina.

Trinta (30) (13,27 %) de 226 amostras totais (incluindo os pools de soro) desta seção foram detectadas pela RT-ddPCR *one-step*, enquanto a RT-qPCR detectou 29 amostras (12,83 %). A RT-ddPCR detectou um soro e um pool de soro a mais que a RT-qPCR, no total de 226 amostras (tabela 9). A estatística Kappa mostrou concordância de 94,2 %, p-value <0.001 com intervalo de confiança de 95% (Baltar; Okano, disponível em <http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/>).

Tabela 9 – Quantidade de amostras detectadas e não detectadas na RT-ddPCR e RT-qPCR

RT-ddPCR	RT-qPCR		Total
	Detectado	Não detectado	
Detectado	28	2	30
Não detectado	1	195	196
Total	29	197	226

A RT-qPCR para beta-actina detectou o gene normalizador em todas as amostras do estudo, confirmando a eficiência da extração dos ácidos nucleicos. A tabela 10 apresenta a quantidade de cópias por vinte (20) microlitros de RNA do SVA detectado pela RT-ddPCR nas 27 amostras positivas das 79 avaliadas, bem como os resultados de CT das RT-qPCR para SVA e beta-actina.

Tabela 10 – Resultados da quantificação absoluta de SVA pela RT-ddPCR e valores de CT das RT-qPCR para SVA e beta-actina nas amostras positivas

	Amostras	RT-ddPCR SVA (cópias/ 20 μL)	RT-qPCR SVA (CT)	RT-qPCR beta-actina (CT)
1	MG-1E	ND	22,97	24,01
2	MG-2E	> 48600	12,28	22,56

3	MG-4E	> 113400	13,59	27,05
4	MG-5E	> 127000	13,36	27,96
5	MG-6E	> 136000	11,17	23,11
6	MG-7E	> 123800	12,05	24,61
7	MG-8E	> 81400	14,3	27,52
8	MG-13E	> 157800	11,34	26,01
9	MG LV 5	> 26760	18,64	28,16
10	GO-198-10M	125	27,08	24,38
11	GO-198-13M	112	27,20	27,34
12	GO-198-14M	1554	25,69	31,05
13	GO-4E	> 68600	19,13	30,81
14	GO-B5596E	35860	15,06	26,32
15	GO-8410E	> 47540	14,77	26,18
16	GO-AP3E	> 69400	14,37	26,80
17	GO-3E	> 28820	14,92	27,32
18	SC-536-1S	280	28,36	31,24
19	SC-536-3S	6,4	ND	32,49
20	SC-536-6 M	19180	19,97	29,61
21	SC-536-5,7M	> 214000	12,35	29,57
22	SC-547-6M	8,8	33,49	31,13
23	SC-486-9,10M	90	32,73	31,18
24	RS-513-4,5,6M	> 113000	10,90	23,21
25	RS-515-9,12M	1458	25,82	25,24
26	RS-515-10M	> 2000000	12,55	34,05
27	RS-515-11M	6260	23,47	32,04
28	RS-91Be	3400	26,27	ND

E- epitélio, LV- líquido vesicular, M-macerado, S-soro, **ND** - não detectado

5.4 Amostras selecionadas para metagenômica viral

Dos resultados encontrados na etapa anterior (item 5.3), 24 amostras foram selecionadas para formarem os *pools* por tipo de amostra (epitélio ou soro sanguíneo) e estado. Para os *pools* de epitélio, foram utilizadas quatro (4) amostras e para os de soro, três (3). A tabela 11 apresenta a composição de cada pool e a tabela 12, os resultados prévios da

ddPCR para SVA por amostra dentro de cada pool. As amostras 01 a 05 obtiveram prévia detecção do SVA por PCR digital antes de serem submetidas ao viroma, embora a amostra 5 apresentou quantificação próxima do limite de detecção em duas (2) de três (3) amostras do pool (tabela 12).

Tabela 11- Descrição dos pools de epitélio ou soro avaliados por metagenômica viral

<i>Pool</i> (amostra biológica)	Estado	Municípios	Composição
01 (epitélio*)	MG	Uberlândia	MG-13E; MG-8E; MG-6E; MG-2E
02 (epitélio)	GO	Rio Verde, Santo Antônio da Barra e Varjão	GO-AP3E; GO-4E; GO-3E; GO-8410E
03 (epitélio)	SC	Arabutã, Irani e Concórdia	SC-536-6M; SC-536-5,7M; SC-547-6M; SC-486-9,10M
04 (epitélio)	RS	Santa Rosa e Estrela	RS-515-10M; RS-515-11M; RS-91bE; RS-A6436E
05 (soro**)	MG	Uberlândia	191-7(S); 191-12(S); 191-19(S)
06 (soro)	RS	Santa Rosa	515-1(S); 515-3(S); 515-7(S)

As amostras biológicas em forma de *pool* totalizaram 18 epitélios (*) e seis soros (**).

Tabela 12- Resultados de quantificação das amostras submetidas ao viroma pela PCR digital para o SVA

Bibliotecas	Indivíduos do pool	PCR digital Cópias/μL	Bibliotecas	Indivíduos do pool	PCR digital Cópias/μL
01- epitélio MG	MG-13E	> 157.800	04 -epitélio RS	RS-515-10M	>2.000.000
	MG-8E	> 81.400		RS-515-11M	6.260
	MG-6E	> 136.000		RS-91bE	3.400
	MG-2E	> 48.600		RS-A6436E	4,2
02- epitélio	GO-AP3E	> 69.400	05- soro MG	191-7(S)	1,8

GO	GO-4E	> 68.600		191-12(S)	14
	GO-3E	> 28.820		191-19(S)	12,6
	GO-8410E	> 47.540		-	-
03- epitélio	SC-536-6M	19.180	06 - soro RS	515-1(S);	2,6
SC	SC-536-5,7M	> 214.000		515-7(S);	4
	SC-547-6M	8,4*		515-3(S)	1,6
	SC-486-9,10M	90		-	-

* Em azul: consideradas não detectadas (abaixo do ponto de corte)

5.5 Metagenômica viral

O sequenciamento paralelo massivo gerou arquivos com tamanhos de 3,8 a 8,7 Gigabytes (GB) por amostra, exceto nas amostras 1 e 2 (tabela 13).

Tabela 13- Tamanho dos arquivos do sequenciamento paralelo massivo nas amostras do surto

Amostras	Tamanho (arquivo .gz)
01- epitélio MG	318,6 MB
02- epitélio GO	739,7 MB
03- epitélio SC	4,4 GB
04 -epitélio RS	4,7 GB
05- soro MG	8,7 GB
06 - soro RS	3,8 GB

De acordo com as análises de qualidade fornecidas pelo PRINSEQ, primeiro software aplicado pelo programa MetLab, foram gerados fragmentos nos sentidos direto (f) e reverso (r) (*pair-end*) de boa qualidade em média de 100 pb (figuras 22 e 23). As amostras 01 e 02 tiveram também sequências menores que 100 pb nas *reads* f do que as demais amostras do estudo (figuras 22 e 23). No que se refere à qualidade das sequências, as *reads* f e r de cada amostra apresentou valores de Phred score acima de 30, exceto a amostra 05 que apresentou valores abaixo de 20 (figuras 24 e 25).

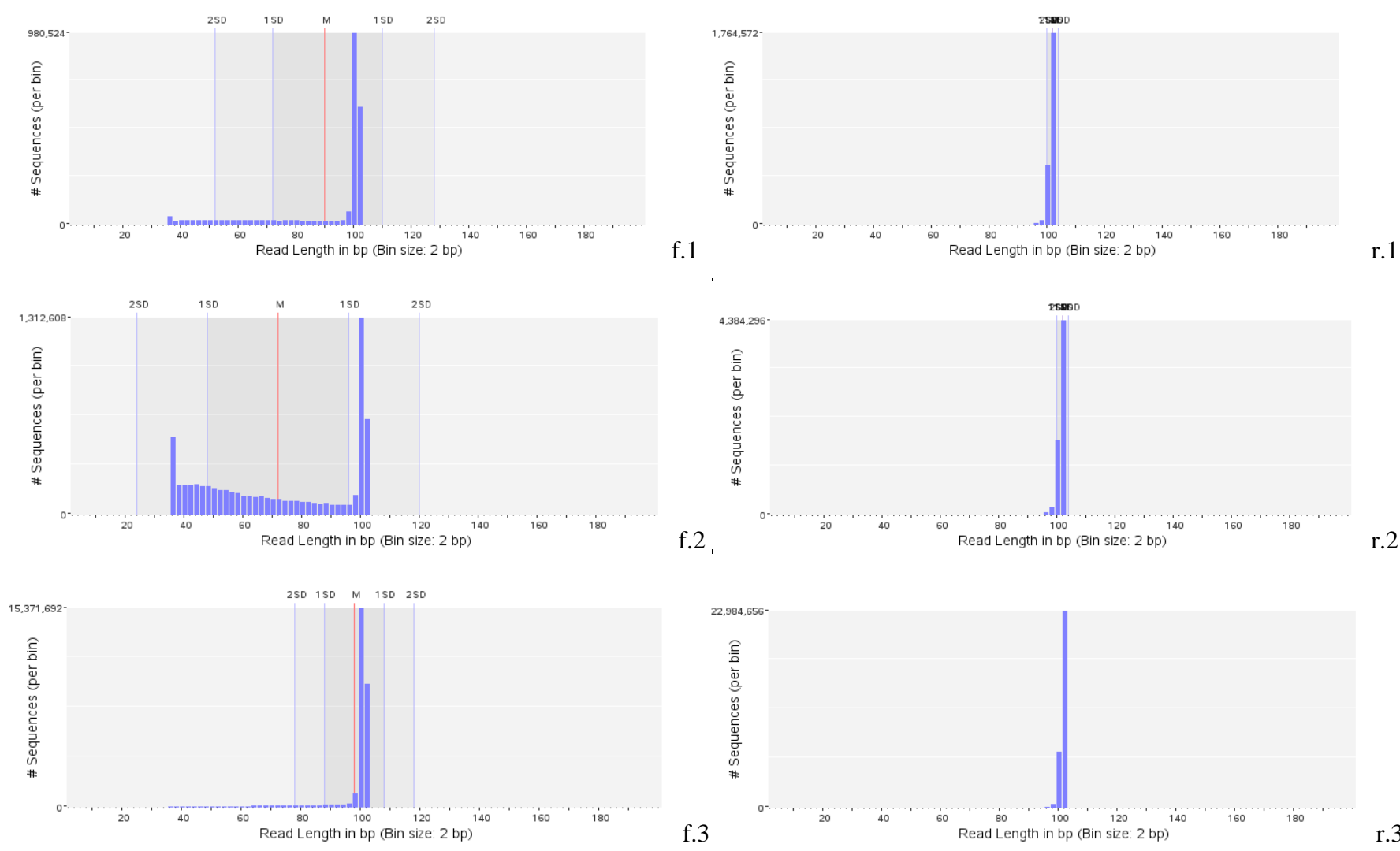
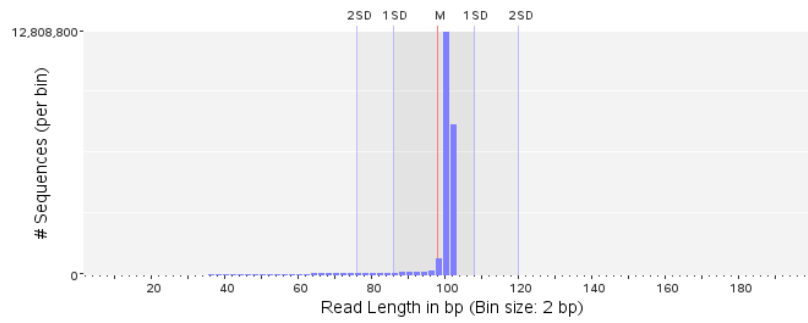
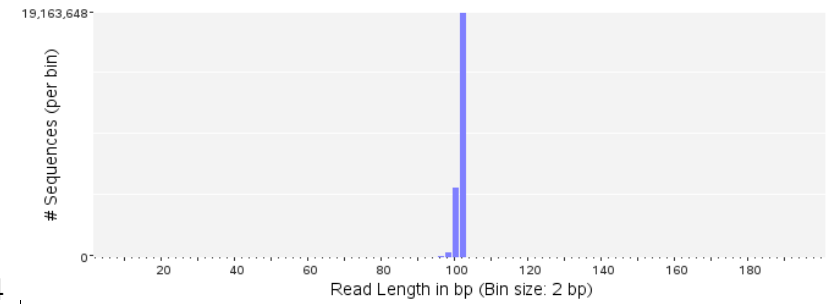


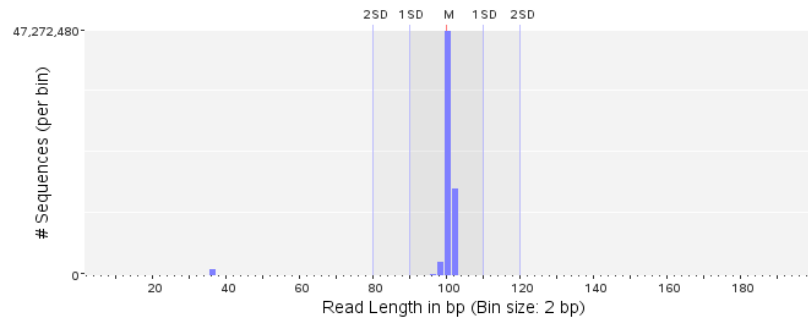
Figura 22 – Número e comprimento das sequências das *reads forward* e *reverse* das amostras 01 a 03 obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab. M: média, SD: desvio padrão.



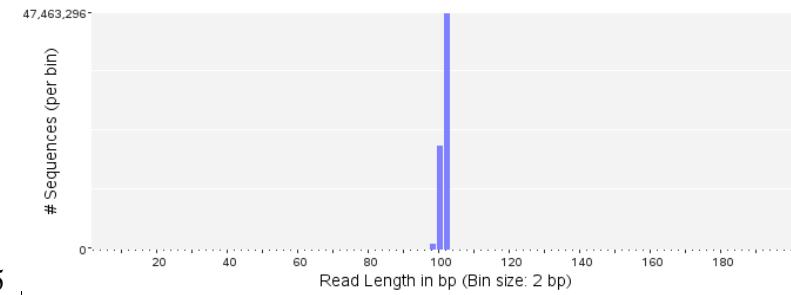
f.4



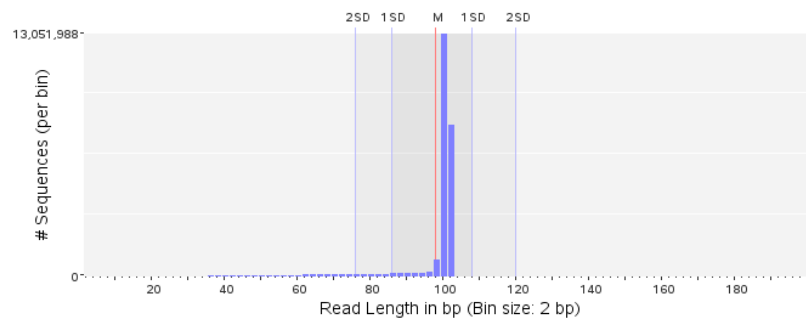
r.4



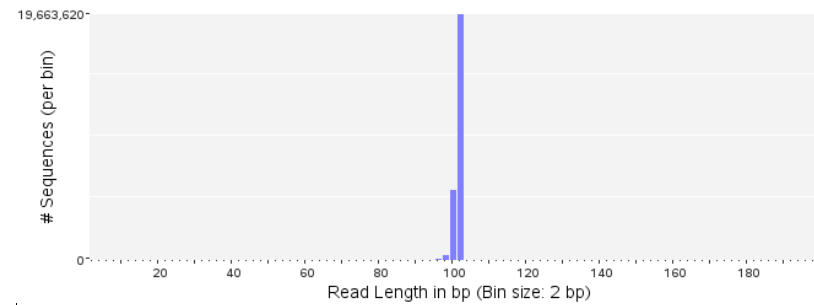
f.5



r.5



f.6



r.6

Figura 23 – Número e comprimento das sequências das *reads forward* e *reverse* das amostras 04 a 06 obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab. M: média, SD: desvio padrão.

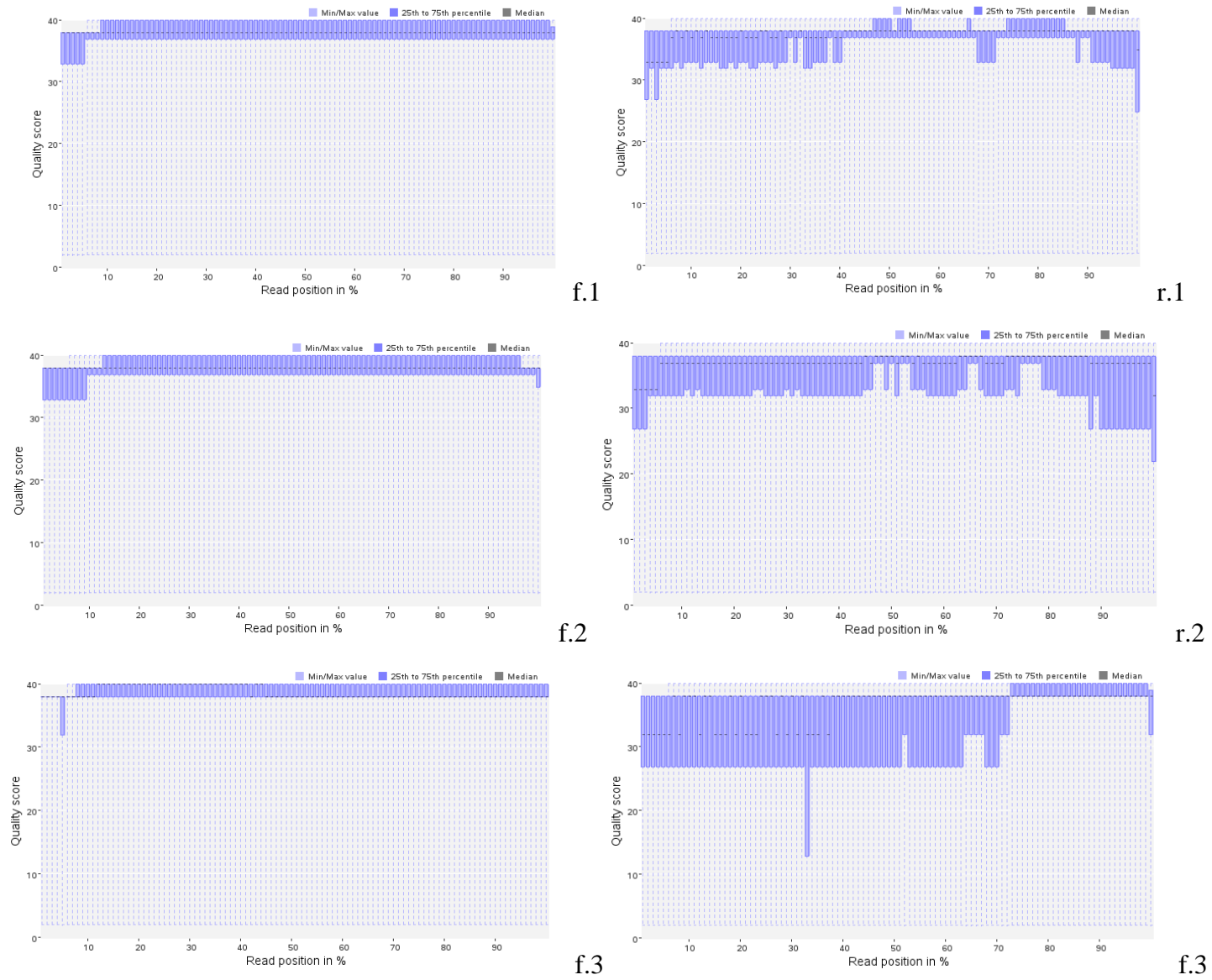
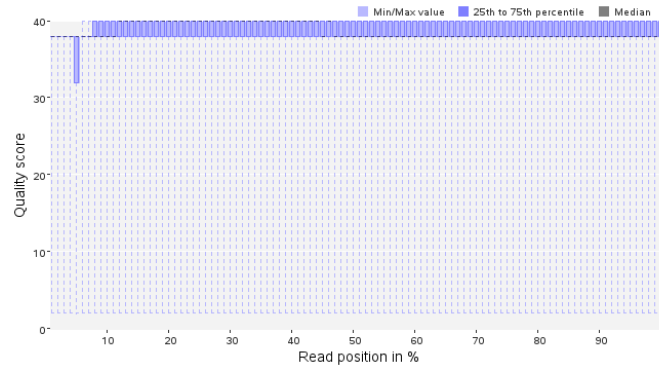
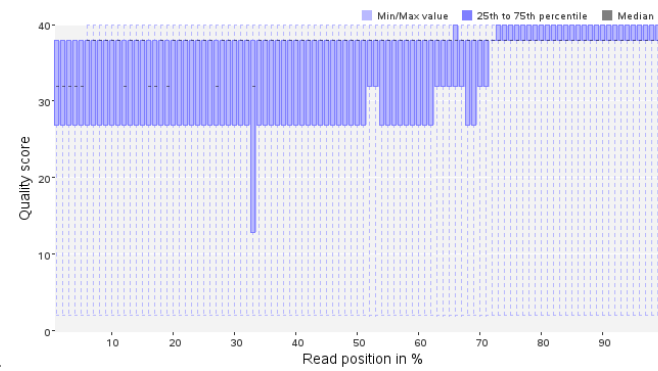


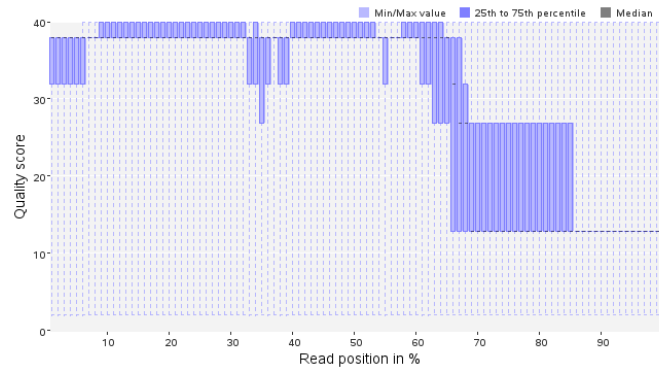
Figura 24 – Qualidade das seqüências das *reads forward* e *reverse* das amostras 1 a 3 em Phred score de 0 a 40, obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.



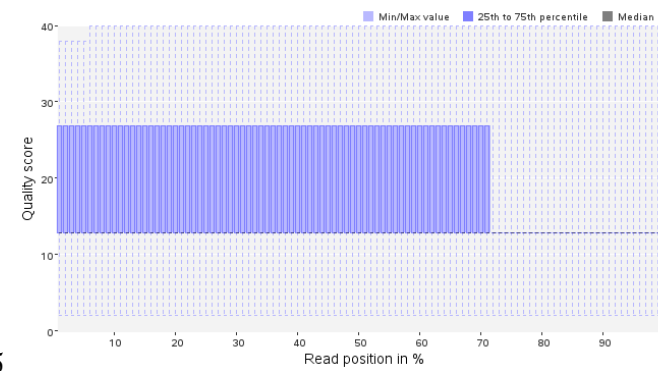
f.4



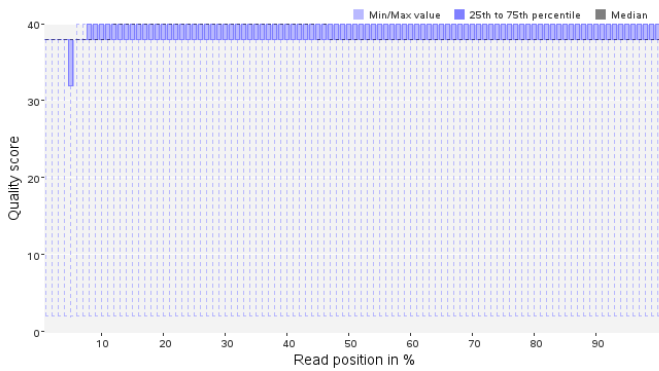
r.4



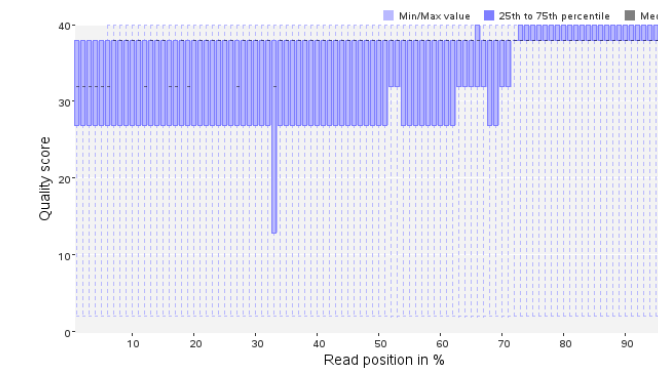
f.5



r.5



f.6



r.6

Figura 25 – Qualidade das sequências das *reads forward* e *reverse reads* amostras 4 a 6 em Phred score de 0 a 40, obtida pelo PRINSEQ presente no MetLab.

O conteúdo GC das sequências das *reads* f e r das amostras do estudo seguiram uma distribuição normal e tiveram o valor de média em torno de 60, conforme a figura 26, representada pela amostra 03 (epitélio de SC).

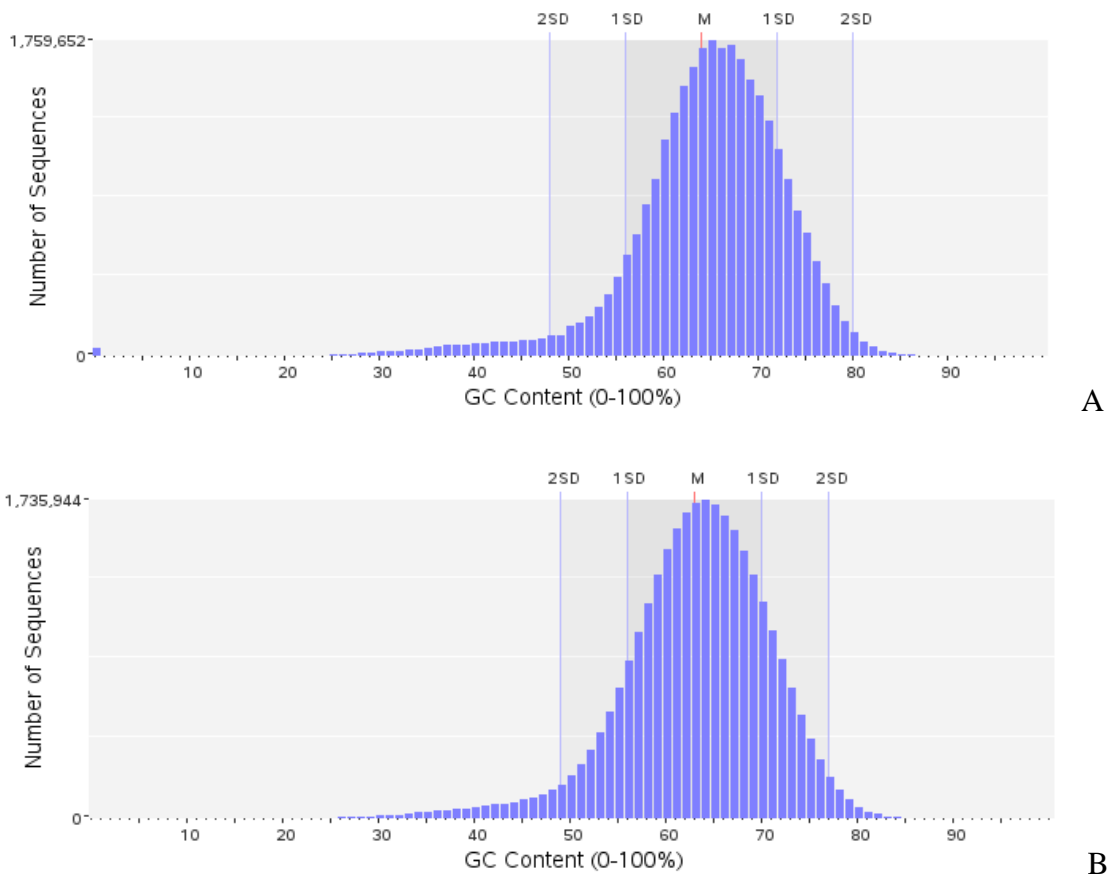


Figura 26 - Gráfico de conteúdo de GC das *reads forward* f (A) e *reverse* r (B) da amostra 03 pelo PRINSEQ. M: marca o conteúdo médio de GC. 1SD e 2SD: representa o conteúdo de GC para um e dois desvios padrão, respectivamente.

Os conjuntos de dados das amostras de 01 a 06 não se agruparam a metagenomas microbianos (de humano, camundongo, peixe e de ambiente marinho) e virais (de humano, de água, camundongo, peixe e mosquito) disponíveis publicamente com base na abundância de dinucleotídeos, sugerindo que as amostras foram corretamente sequenciadas e não sofreram contaminação de DNA de outras fontes. A figura 27 ilustra a análise de componentes principais (PCA) obtida pelo PRINSEQ da amostra 03 frente a metagenomas microbianos (M) e a figura 28, frente à metagenomas virais (V) disponíveis.

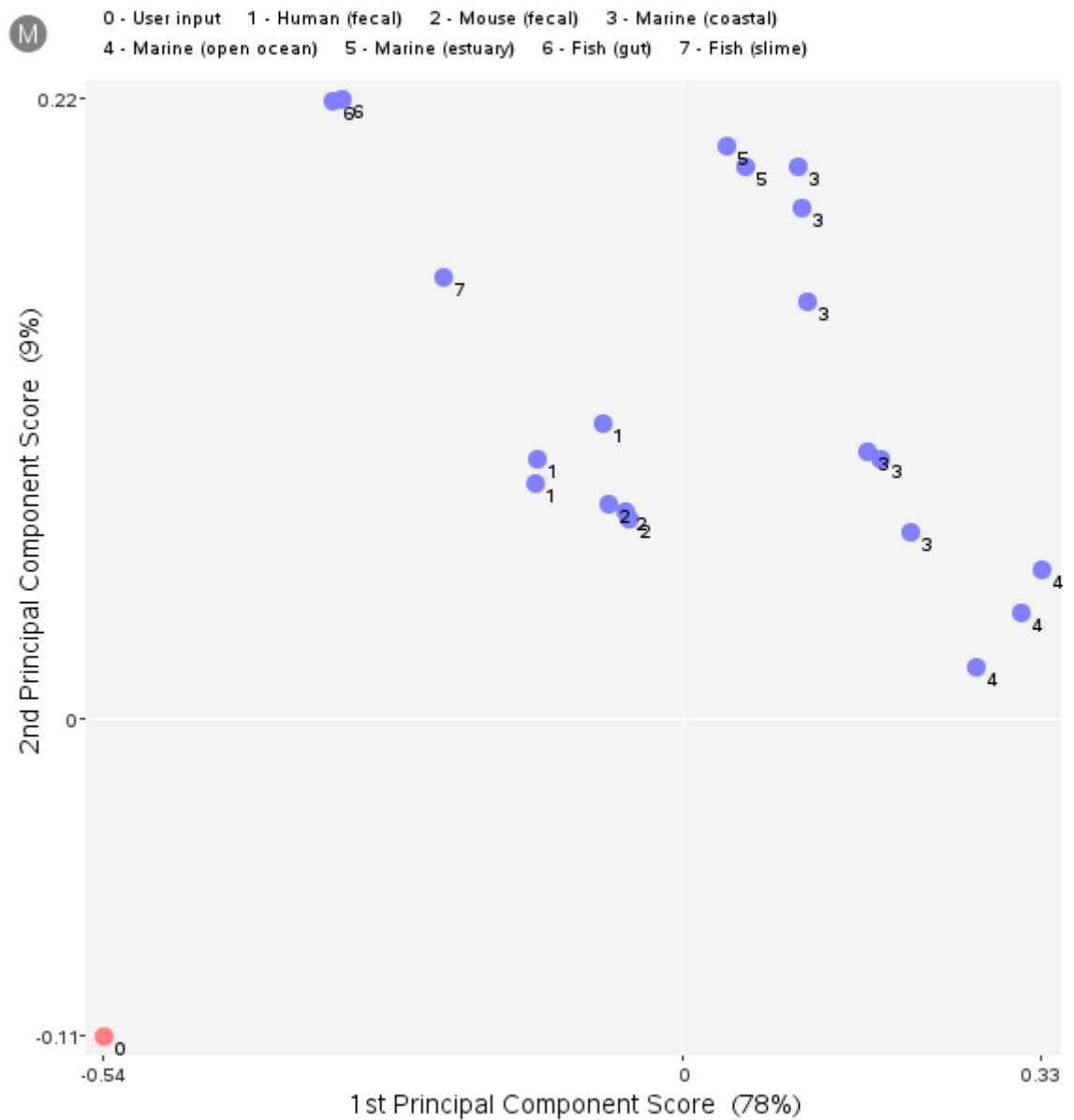


Figura 27 – Gráfico de componente principal (PCA) pelo PRINSEQ da amostra 03 (input 0- círculo vermelho) em relação à metagenomas microbianos de amostras de humanos, rato, litoral marinho, oceano aberto, estuário e peixe (intestino e muco) (círculos na cor roxa).

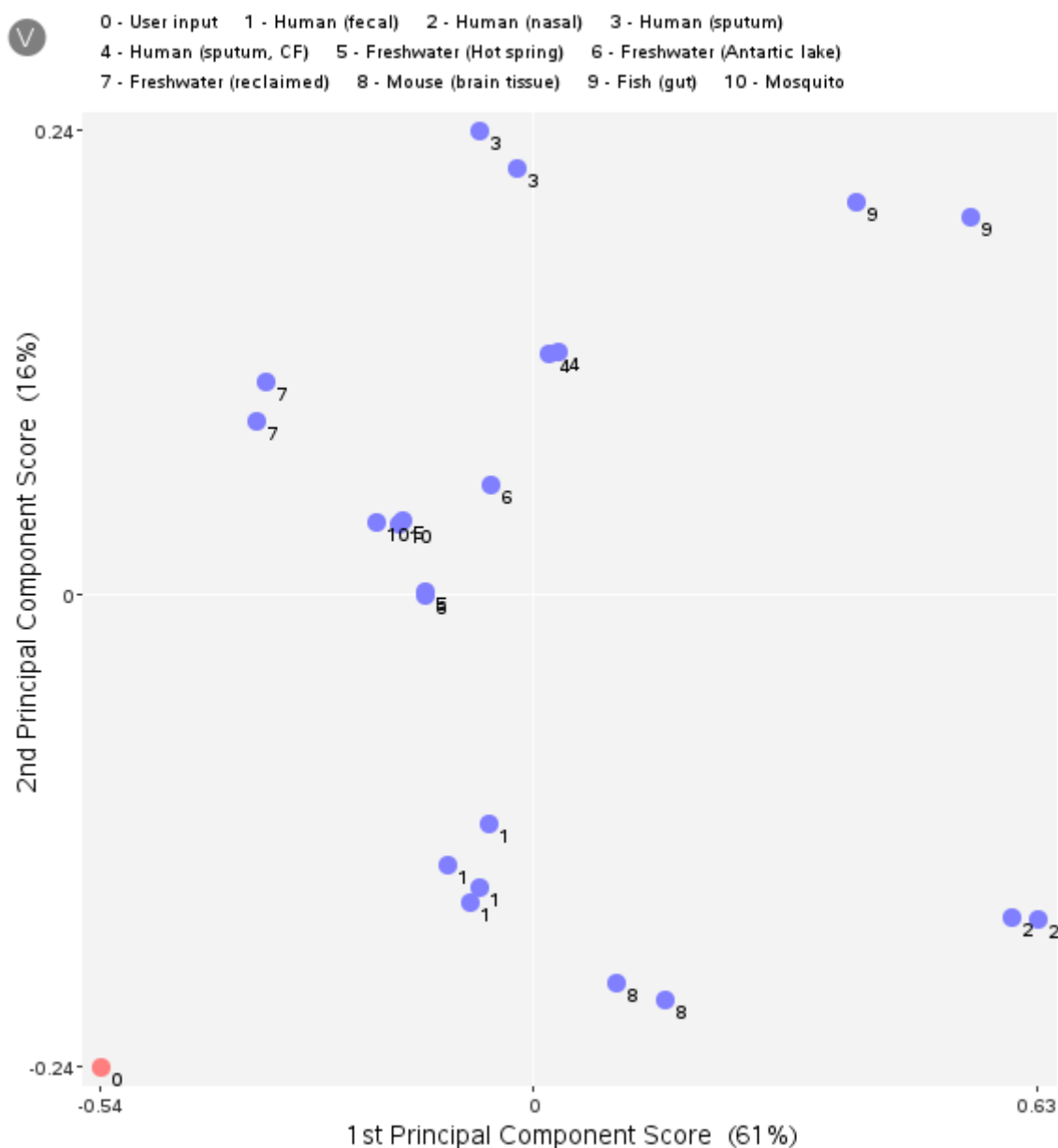


Figura 28 - Gráfico de componente principal (PCA) pelo PRINSEQ da amostra 03 (input 0- círculo vermelho) em relação a metagenomas virais de fezes, secreções nasais, e escarro humano, água doce (nascente, lago Antártico, recuperada/ reciclada), tecido cerebral de rato, intestino de peixe e mosquito (círculos na cor roxa).

Os dados brutos fornecidos pelo PRINSEQ indicaram uma profundidade acima de 2.000.000 de *reads* e no máximo em torno de 69.000.000 (números de *reads* totais). A tabela 14 apresenta os dados fornecidos pelos programas PRINSEQ (trimagem e filtragem) e Bowtie (alinhamento com o hospedeiro) presentes no *pipeline* do MetLab.

Tabela 14- Número de *reads* totais e após avaliação do PRINSEQ (número de *reads* de boa qualidade) e Bowtie (número de *reads* do hospedeiro e utilizados para montagem)

Amostras	N ° <i>reads</i> Totais	N ° <i>reads</i> boa qualidade (%)	N ° <i>reads</i> hospedeiro (%)	N° <i>reads</i> para montagem (%)
01- epitélio MG	2.374.802	1.715.350 (72,23)	129.509 (7,55)	1.585.841 (92,45)
02- epitélio GO	6.338.322	4.071.377 (64,23)	149.827 (3,68)	3.921.550 (96,32)
03- epitélio SC	30.065.728	29.094.342 (96,76)	8728 (0,03)	29.085.614 (99,97)
04 -epitélio RS	25.036.952	24.235.740 (96,80)	2.424 (0,01)	24.233.316 (99,99)
05- soro MG	69.681.664	7.442.903 (10,68)	59.543 (0,8)	7.383.360 (99,2)
05- soro MG- single (f)*	69.681.664	63.963.672 (91,79)	57.567 (0,09)	63.906.105 (99,91)
06 - soro RS	25.729.784	25.027.694 (97,27)	10.011 (0,04)	25.017.683 (99,96)

* f – apenas com a *read forward* (single end)

As amostras três (3), quatro (4) e seis (6) em *pair-end* são as que apresentaram as maiores quantidades de *reads* de boa qualidade em relação ao total de *reads* brutas (acima de 95 %). As amostras um (1) e dois (2) obtiveram aproximadamente 72 e 64 %, respectivamente, do total de *reads* com boa qualidade dos dois arquivos (senso e antisenso) (tabela 14). No entanto, a amostra 05 (*pair-end*) apresentou apenas 10,68 % do total de sequências brutas com boa qualidade. Esse resultado foi atribuído principalmente ao arquivo r (antisenso) que obteve a maior quantidade de sequências ruins em relação ao f (senso) (tabela 15 e figura 24). Os resultados das amostras mostrados nas figuras são a partir da montagem das duas *reads* (f e r). No entanto, todo o *pipeline* do MetLab foi novamente rodado na amostra 05 utilizando somente a *read forward* e também apresentado.

Tabela 15- Número de sequências de baixa qualidade obtido pelo log de dados do PRINSEQ presente no MetLab

Amostras	Arquivo <i>single end</i>	Número de sequências Totais	Número de Sequências de baixa qualidade (%)
01- epitélio MG	F	2.374.802	623.333 (26,25 %)
	R		643.086 (27,08 %)
02- epitélio GO	F	6.338.322	1.910.740 (30,15 %)
	R		2.040.197 (32,19 %)

03- epitélio SC	F	30.065.728	565.111 (1,88 %)
	R		915.198 (3,04 %)
04- epitélio RS	F	25.036.952	493.101 (1,97 %)
	R		748.805 (2,99 %)
05- soro MG	F	69.681.664	5.717.992 (8,21 %)
	R		61.176.036 (87,80 %)
06 - soro RS	F	25.729.784	439.761 (1,71 %)
	R		634.451 (2,47 %)

Nota-se também, na tabela 14, que a quantidade de *reads* do hospedeiro (suínos) foi abaixo de 8 %. No diz respeito à etapa de montagem, realizada pelo Spades, presente no *pipeline* do MetLab, as amostras 01, 02 e 05 foram as que apresentaram a possibilidade de montagem do maior número de sequências (tabela 16). Entretanto, as amostras 03, 04 e 06, embora com menor número de sequências montadas, foram a que apresentaram a montagem de fragmentos maiores.

Na classificação taxonômica realizada pelo Kraken nas amostras em *pair-end*, presente no *pipeline* do MetLab, em todas as amostras, o maior percentual de sequências foi classificado como bactérias e entre 1 a 5 %, como vírus. Além disso, há um percentual significativo de sequências não classificadas (tabela 16). Quando aplicado um filtro de 150 pb, os resultados sofreram modificações como o decréscimo de sequências desconhecidas, aumento no número de sequências bacterianas na maioria das amostras e diminuição das sequências virais classificadas. As figuras 29, 30 e 31 apresentam também uma visão geral de sequências não classificadas e classificadas como bactérias e vírus (em destaque) antes e com o filtro de 150 pb. As tabelas 16 e 17 apresentam também os resultados em *single-end* da amostra 05.

Tabela 16- Dados obtidos na etapa de montagem (número total de sequências) e na etapa de classificação

Amostras	Nº total sequências	Nº sequências não classificadas (%)	Nº fragmentos classificadas Bactérias (%)	Nº fragmentos classificadas Vírus (%)
----------	---------------------	-------------------------------------	---	---------------------------------------

01	28.880	10.306 (36)	17.613 (61)	940 (3)
02	335.367	139.204 (42)	177.385 (53)	16.670 (5)
03	2392	1097 (45,86)	1236 (51,67)	39 (1,63)
04	1136	241 (21,21)	843 (74,21)	13 (1,14)
05	26.654	11.584 (42)	13597 (51)	610 (2)
05 f*	34.005	11.645 (34,24)	10.544 (31)	1350 (3,97)
06	1051	248 (23,60)	774 (73,64)	14 (1,33)

*f – apenas com a *read* forward (single end)

Tabela 17- Dados obtidos na etapa de montagem (número total de sequências) e na etapa de classificação após filtro de 150 pb, adicionado no *pipeline*

Amostras	Nº total sequências	Nº sequências não classificadas (%)	Nº fragmentos <i>classificadas Bactérias (%)</i>	Nº fragmentos <i>classificadas Vírus (%)</i>
01	15.923	1494 (9,38)	14.319 (89,93)	104 (0,65)
02	31.281	4965 (15,87)	25.679 (82,09)	589 (1,88)
03	2212	913 (43,23)	1155 (54,69)	34 (1,61)
04	930	119 (12,80)	769 (82,69)	11 (1,18)
05	17.747	4186 (23,59)	13438 (75,72)	78 (0,44)
05 f*	10.610	1989 (18,75)	8526 (80,36)	41 (0,39)
06	893	192 (21,50)	691 (77,38)	6 (0,67)

*f – apenas com a *read* forward (single end)

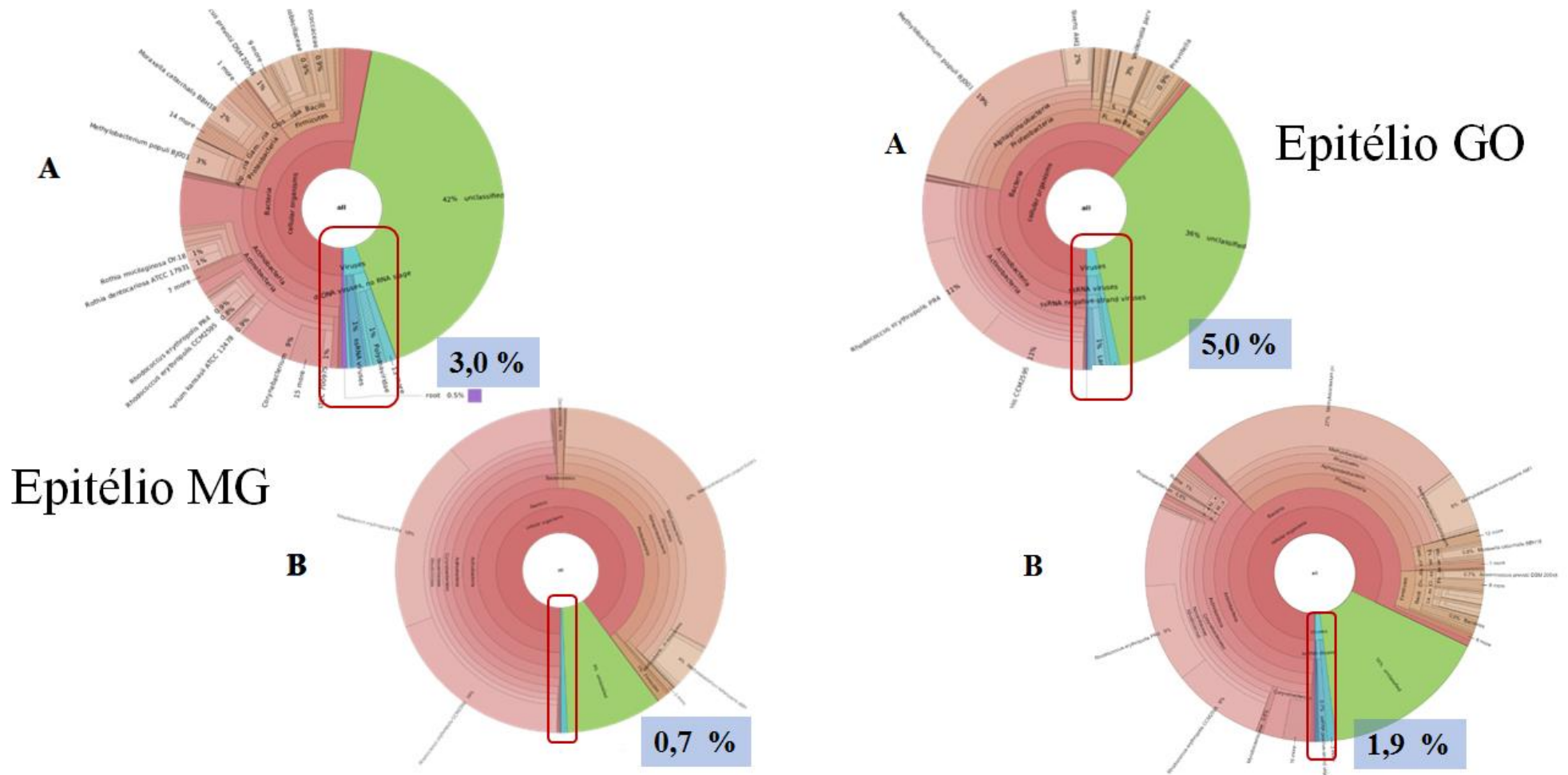


Figura 29 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Minas Gerais e Goiás pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B). Em **rosa**, seqüências classificadas como bactérias; **verde**: não classificadas; **roxo e azul**: classificadas como vírus. Números em porcentagem representam a proporção de seqüências virais em relação ao total de seqüências.

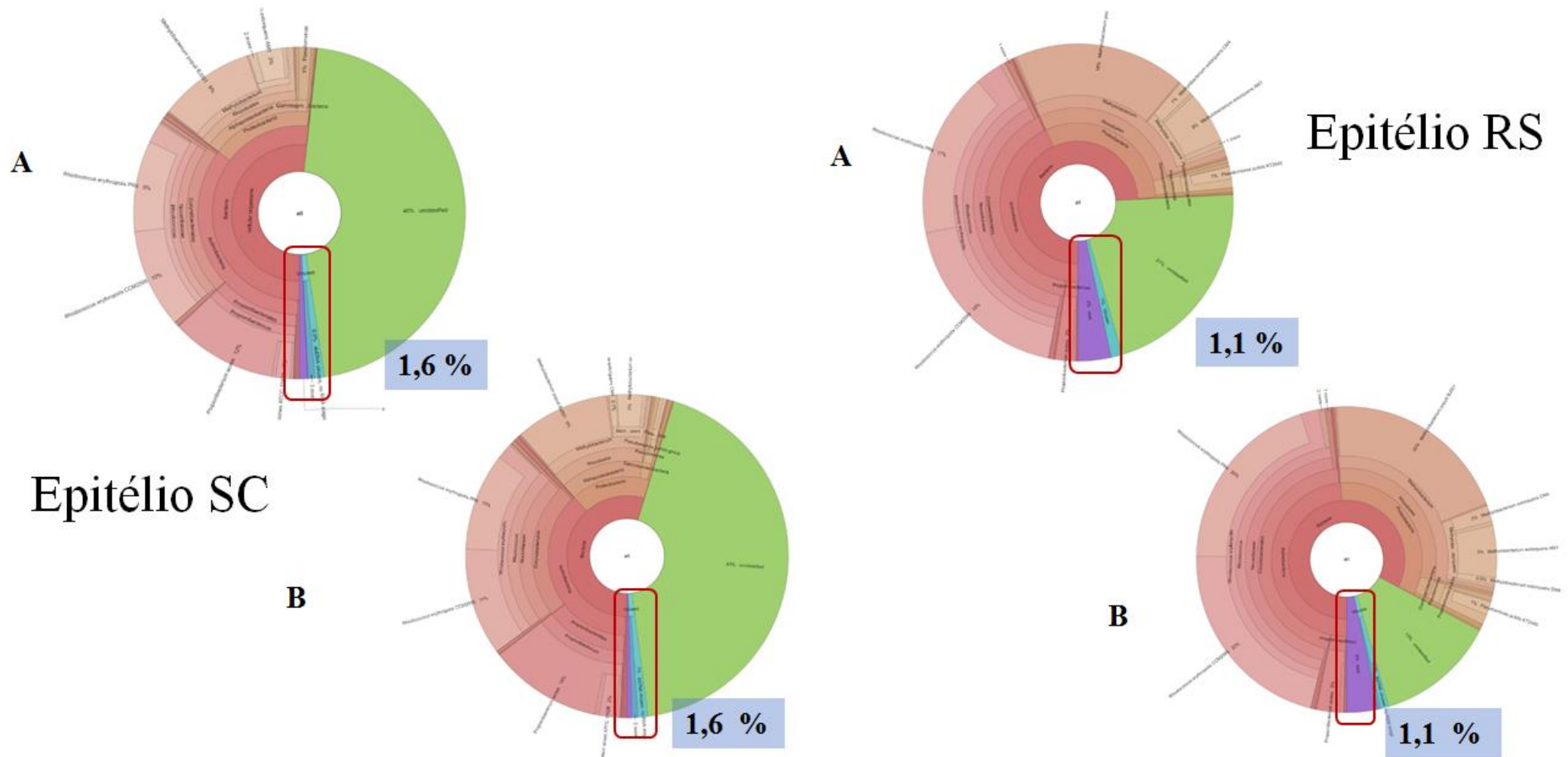


Figura 30 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Santa Catarina e Rio Grande do Sul pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B). Em **rosa**, sequências classificadas como bactérias; **verde**: não classificadas; **roxo e azul**: classificadas como vírus. Números em porcentagem representam a proporção de sequências virais em relação ao total de sequências.

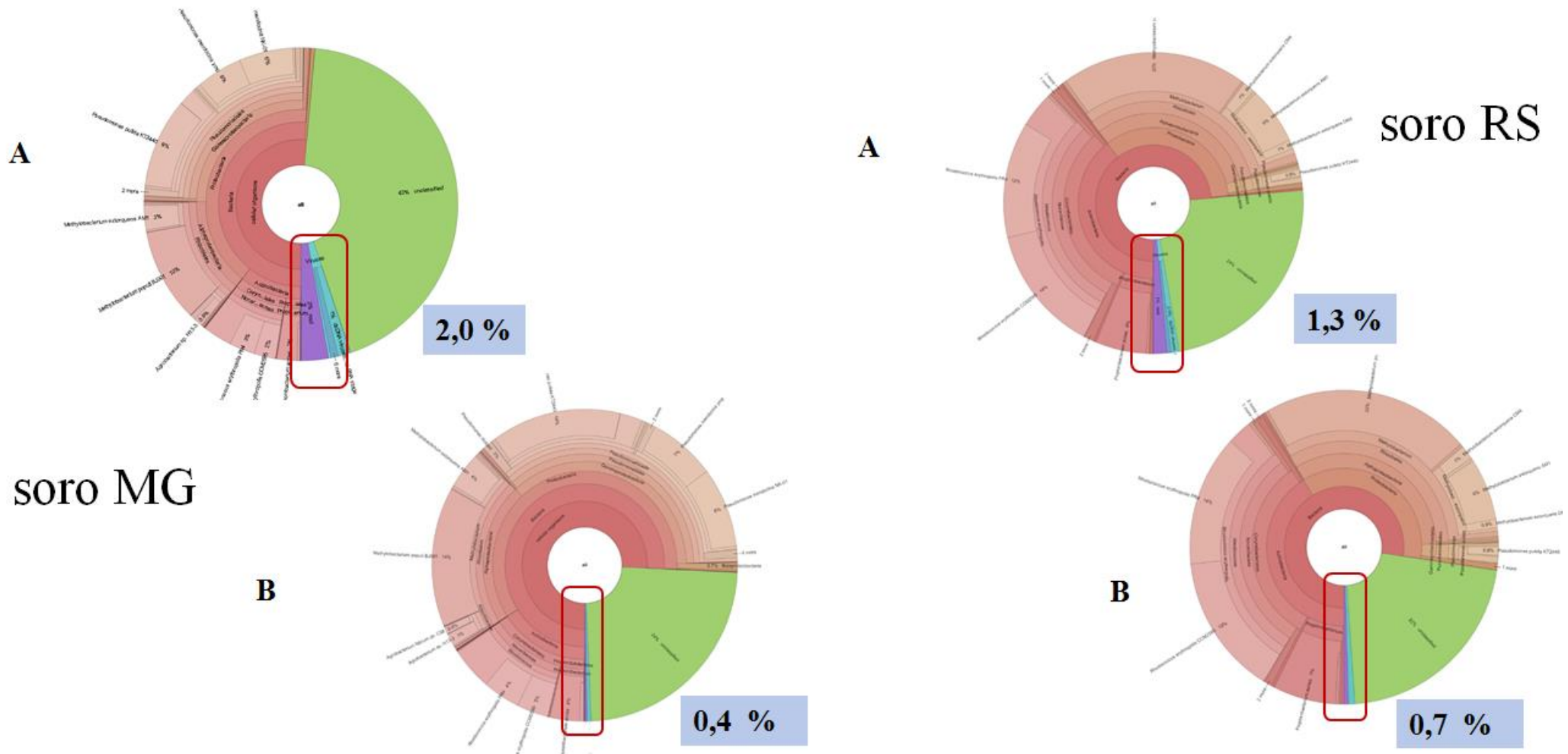


Figura 31 – Classificação taxonômica geral das amostras de epitélio de Santa Catarina e Rio Grande do Sul pelo Kraken/krona utilizados pelo MetLab antes (A) e após filtro (B). Em **rosa**, seqüências classificadas como bactérias; **verde**: não classificadas; **roxo e azul**: classificadas como vírus. Números em porcentagem representam a proporção de seqüências virais em relação ao total de seqüências.

Ainda na classificação utilizando o MetLab, foram encontrados vírus de RNA e DNA de diferentes famílias, totalizando 19 famílias de vírus de RNA e 21 de DNA, encontradas nas amostras. No entanto, com a utilização do filtro de 150 pb adicionado neste trabalho, 13 famílias de vírus de RNA foram classificadas e 14 de DNA. A tabela 18 apresenta as famílias de vírus de RNA e DNA classificadas com e sem filtro de 150 pb.

Tabela 18- Famílias classificadas de vírus de RNA e DNA com e sem filtro de 150 pb

Amostras	Família (RNA)	Família (DNA)
01 – epitélio MG	<i>Arenaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae, Hypoviridae, Iflaviridae, Partitiviridae, Picornaviridae, Reoviridae, Retroviridae</i>	<i>Baculoviridae, Iridoviridae, Herpesviridae, Podoviridae, Polydnviridae, Poxviridae, Siphoviridae</i>
02- epitélio GO	<i>Arteriviridae, Arenaviridae, Astroviridae, Bromoviridae, Bunyaviridae, Closteroviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepeviridae, Hypoviridae, Iflaviridae, Narnaviridae, Nodaviridae, Partitiviridae, Picornaviridae, Potyviridae, Reoviridae, Retroviridae, Secoviridae, Togaviridae, Virgaviridae</i>	<i>Adenoviridae, Alloherpesviridae, Anelloviridae, Ascoviridae, Baculoviridae, Geminiviridae, Hesperviridae, Iridoviridae, Mimiviridae, Myoviridae, Nudiviridae, Papillomaviridae, Phycodnaviridae, Podoviridae, Polydnviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Siphoviridae</i>
03- epitélio SC	<i>Flaviviridae, Picornaviridae, Potyviridae, Retroviridae</i>	<i>Herpesviridae, Inoviridae, Microviridae, Papillomaviridae, Polydnviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Siphoviridae</i>
04 – epitélio RS	<i>Flaviviridae e Retroviridae</i>	<i>Adenoviridae, Microviridae Phycodnaviridae, Polydnviridae, Siphoviridae</i>
05- soro MG	<i>Alphaflexiviridae, Bromoviridae, Bunyaviridae, Closteroviridae, Flaviviridae, Partitiviridae, Picornaviridae, Potyviridae, Reoviridae e Retroviridae</i>	<i>Adenoviridae, Alloherpesviridae, Baculoviridae, Geminiviridae, Herpesviridae, Inoviridae, Iridoviridae, Microviridae, Mimiviridae, Myoviridae, Nimaviridae, Papillomaviridae, Phycodnaviridae, Polydnviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Siphoviridae</i>
05- soro MG – single (f)*	<i>Arenaviridae, Betaflexiviridae, Bromoviridae, Bunyaviridae, Closteroviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Orthomyxoviridae, Partitiviridae, Picornaviridae, Potyviridae, Retroviridae, Togaviridae, Virgaviridae</i>	<i>Adenoviridae, Alloherpesviridae, Baculoviridae, Geminiviridae, Herpesviridae, Iridoviridae, Microviridae, Myoviridae, Papillomaviridae, Phycodnaviridae, Polydnviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Siphoviridae</i>

- * em vermelho as famílias da Ordem *Picornavirales*
- * em azul: famílias não encontradas após filtro de 150 pb
- * f – apenas com a *read forward* (single end)

As famílias de RNA mais predominantes com e sem filtro foram a *Picornaviridae*, classificada em quatro (4) de seis (6) amostras e a família *Retroviridae*, presente em todas as amostras do estudo. No que se refere às famílias de DNA, as mais predominantes foram a *Polydnaviridae*, presente em todas amostras, seguida pela família *Siphoviridae*, que foi classificada em cinco (5) de seis (6) amostras; e as *Microviridae* e *Papillomaviridae*, em quatro amostras e *Adenoviridae* presente na metade das amostras (3).

O *Senecavirus A*, objeto maior deste estudo, assim como outros vírus pertencentes à família *Picornaviridae* foram detectados. A tabela 19 apresenta os vírus pertencentes a gêneros dessa família fornecidos pelo *pipeline* do MetLab, bem como o número de sequências após filtro de 150 pb adicionado entre as etapas de montagem e classificação. Além disso, mostra o e-value/identidade/cobertura pelo BLASTn (NCBI) e maior *contig* em relação ao táxon de interesse dessa classificação após filtro.

Após o filtro de 150 pb e o alinhamento pelo BLAST+ e BLASTn (NCBI) do *contig*, o *Senecavirus A* foi o único vírus da família *Picornaviridae* que se manteve presente nas amostras (negrito) (tabela 19).

Tabela 19- Agentes virais classificados pertencentes à família *Picornaviridae*

Amostras	Gêneros da família <i>Picornaviridae</i>	Vírus	Quantidade de fragmentos atribuídos ao táxon	Quantidade de fragmentos após filtro (150 pb)	E-value (E) /identidade (I)/ cobertura (C) do maior contig
01 – epitélio MG	<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>	97	44	E: 0.00 / I: 403/428 (94%) / C: 428/459
02 – epitélio GO	<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>	441	83	E: 5e-111/ I: 222/226 (98%) / C: 226/336
	<i>Theilovirus</i>	<i>Saffold virus</i>	26	0	NA
	<i>Theilovirus</i>	<i>Theiler's encephalomyelitis</i>	24	01	Não encontrado
	<i>Parechovirus</i>	<i>Human parechovirus</i>	22	0	NA

	<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus A</i>	01	0	NA
	<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus O</i>	01	0	NA
	<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus SAT1</i>	01	0	NA
	<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus SAT2</i>	01	0	NA
03- epitélio SC	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i>	03	0	NA
	<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>	03	02	E: 0.0 / I: 6172/6569 (94%) / C: 6569/6725
04- epitélio RS	-	-	-	-	NA
05- soro MG	<i>Enterovirus</i>	<i>Rhinovirus C</i>	01	01	Não encontrado
05- soro MG -f*	<i>Senecavirus</i>	<i>Senecavirus A</i>	02	02	E: 2e-125/ I: 249/252 (99%) / C: 252/255
	<i>Theilovirus</i>	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	01	0	NA
		<i>Saffold virus</i>	02	0	NA
06- soro RS	-	-	-	-	-

NA: não aplicado / Não encontrado: nenhum hit encontrado no alinhamento com o táxon em questão e/ou com outro organismo (BLASTn-NCBI)

* f – apenas com a *read* forward (single end)

negrito – contig considerado validado pelo alinhamento

Outros gêneros que contêm vírus que induzem enfermidades vesiculares em suínos foram também detectados, considerados de controle da segurança da sanidade animal. Entretanto, no nível de espécie, os vírus encontrados não são descritos na literatura como indutores de enfermidades vesiculares em suínos e não permaneceram após o filtro, assim como não foram detectados após alinhamento pelo Blast+ e BLASTn (NCBI) (tabela 20).

Tabela 20- Outros gêneros relacionados com agentes causadores de enfermidades vesiculares

Amostras	Gêneros (Família)	Vírus	Quantidade de sequências relacionadas ao taxon	Quantidade de fragmentos após filtro (150 pb)	E-value (E) / identidade (I) / cobertura (C) do maior contig
01 – epitélio MG	<i>Orthopoxvirus</i> (Poxviridae)	<i>Variola virus</i>	01	0	NA
02 – epitélio GO		<i>Variola virus</i>	112	07	Não encontrado
		<i>Cowpox virus</i>	14	0	NA

	<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Poxviridae</i>)	<i>Monkeypox virus</i>	17	03	Não encontrado
		<i>Vaccinia</i>	06	0	NA
	<i>Varicellovirus</i> (<i>Herpesviridae</i>)	<i>Human herpesvirus 3</i>	28	0	NA
	<i>Pestivirus</i> (<i>Flaviviridae</i>)	<i>Classical swine fever</i>	23	01	Não encontrado
03- epitélio SC	<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Poxviridae</i>)	<i>Monkeypox virus</i>	03	02	Não encontrado
04- epitélio RS	-	-	-	-	-
05- soro MG	<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Poxviridae</i>)	<i>Cowpox virus</i>	02	0	NA
		<i>Variola virus</i>	03	0	NA
		<i>Monkeypox virus</i>	05	05	Não encontrado
	<i>Varicellovirus</i> (<i>Herpesviridae</i>)	<i>Suid herpesvirus 1</i>	01	0	NA
		<i>Cowpox virus</i>	01	0	NA
05- soro MG -f*	<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Poxviridae</i>)	<i>Variola virus</i>	07	0	NA
		<i>Monkeypox virus</i>	03	03	Não encontrado
06- soro RS	-	-	-	-	-

NA: não aplicado / **Não encontrado**: nenhum hit encontrado no alinhamento com o táxon em questão e/ou com outro organismo (Blastn-NCBI) / * f – apenas com a *read forward* (single end)

Além desses vírus mencionados anteriormente ou gêneros que podem estar associados a um quadro de surto de enfermidade vesicular foram classificados também, nas amostras do presente estudo, agentes virais com material genético de RNA como arbovírus, vírus de mamíferos, humanos, abelhas, arbovírus, retrovírus, micovírus, vírus de planta, satélites e fagos (tabela 21). Entretanto, após alinhamento com Blast+ e Blastn (NCBI), nenhum vírus foi considerado positivo, devido a não detecção ou pela baixa cobertura de alinhamento mesmo apresentando elevados valores de E-value e identidade/similaridade ou ainda por serem sequências conservadas ou repetitivas também presentes em outras espécies como seres humanos, peixes e plantas, conforme mostrados no final da tabela pelos símbolos*.

Tabela 21- Demais vírus de RNA classificados por amostra após filtro de 150 pb

Amostra	Família	Vírus	Quantidade de fragmentos após filtro (150 pb)	E-value (E) / identidade (I) / cobertura (C) do maior contig
01 – epitélio MG	<i>Arenaviridae</i>	<i>Lassa mammarenavirus</i>	20	E: 3e-29 / I: 72/74 (100 %) / C: 74/198
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Simbu virus</i>	3	E: 7e-13 / I: 40/40 (100 %) / C: 40/153
		<i>Bunyamwera virus</i>	2	Não encontrado

		<i>Ngari virus</i>	2	E: 6e-30 / I: 67/68 (99 %) / C: 68/189
		<i>Shamonda virus</i>	2	E: 1e-15 / I: 53/57 (93%) / C: 57/156
		<i>Tete virus</i>	1	E: 2e-21 / I: 54/56 (96 %) / C: 56/198
		<i>Ukuniemi virus</i>	1	Não encontrado
		<i>Zaliv Terpenia virus</i>	1	E: 2e-17 / I: 41/41 (100 %) / C: 41/170
		<i>Oxbow virus</i>	1	E: 1e-16 / I: 40/41 (98 %) / C: 40/188
	<i>Retroviridae</i>	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>	16	Não encontrado
	<i>Hypoviridae</i>	<i>Trichoderma hypovirus</i>	5	E: 3e-21/ I: 56/59 (95 %) / C: 59/181
02 – epitélio GO	<i>Arenaviridae</i>	<i>Lassa mammarenavirus</i>	11	E: 3e-29 / I: 72/74 (100 %) / C: 74/198
	<i>Astroviridae</i>	<i>Mouse astrovirus M-52/USA/2008</i>	2	Não encontrado
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Shamonda virus</i>	9	E: 2e-25/ I: 81/89 (91 %) / C: 89/208
		<i>Bunyamwera virus</i>	5	Não encontrado
		<i>Ngari virus</i>	5	E: 1e-16/ I: 43/44 (98 %) / C: 44/190
		<i>Tete virus</i>	5	E: 9e-30/ I: 69/71 (97 %) / C: 71/181
		<i>Simbu virus</i>	3	E: 3e-08/ I: 32/32 (100 %) / C: 32/183
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	4	E: 3e-08/ I: 115/136 (85%) / C: 136/183* ¹
		<i>Trichoderma hypovirus</i>	4	E: 2e-23/ I: 58/60 (97%) / C: 60/190
		<i>Sacbrood virus CSBV-LN/China/2009</i>	3	Não encontrado
	<i>Nodaviridae</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii nodavirus</i>	1	Não encontrado
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Hop trefoil cryptic virus 2</i>	2	Não encontrado
		<i>Dill cryptic virus 2</i>	1	Não encontrado
		<i>Heterobasidion partitivirus 17</i>	1	Não encontrado
		<i>Heterobasidion partitivirus 1</i>	3	Não encontrado
	<i>Unclassified Partitiviridae</i>	<i>Rosellinia necatrix partitivirus 4</i>	1	Não encontrado
		<i>Heterobasidion partitivirus 7</i>	1	Não encontrado
		<i>Rhizoctonia fumigata partitivirus</i>	1	Não encontrado
	<i>Reoviridae</i>	<i>Baku virus</i>	4	E: 6e-17/ I: 41/41 (100%) / C: 41/154

	<i>Retroviridae</i>	<i>Human-T-lymphotropic virus 1</i>	30	E: 1e-11/ I: 35/35 (100 %) / C: 35/197
		<i>Woolly monkey sarcoma virus</i>	1	Não encontrado
		<i>Porcine endogenous retrovirus A</i>	1	E: 6e-20/ I: 48/49 (98 %) / C: 49/153
		<i>Human endogenous retrovirus K/HML6</i>	2	Não encontrado
		<i>Human endogenous retrovirus H HERV-H/env60</i>	1	Não encontrado
	<i>Secoviridae</i>	<i>Tomato torrado virus</i>	2	Não encontrado
	<i>Togaviridae</i>	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>	1	Não encontrado
		<i>Chikungunya virus</i>	1	Não encontrado
	-	<i>Maize stripe virus</i>	11	Não encontrado
	-	<i>Escherichia coli 0157 typing phage 7</i>	4	Não encontrado
	-	<i>Jingmen tick virus</i>	5	Não encontrado
03- epitélio SC	<i>Potyviridae</i>	<i>Papaya ringspot virus</i>	1	Não encontrado* ²
	<i>Retroviridae</i>	<i>Human endogenous retrovirus H HERV-H/env62</i>	1	E: 1e-87/ I: 200/216 (93 %) / C: 216/226* ³
		<i>Human endogenous retrovirus H HERV-H/env60</i>	1	E: 4e-52/ I: 140/158 (89 %) / C: 158/228* ⁴
		<i>Human endogenous retrovirus HERV-K (I)</i>	1	E: 6e-74/ I: 156/161 (97 %) / C: 161/169* ⁵
		<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>	1	E: 8e-50/ I: 151/174 (87 %) / C: 174/228* ⁶
04 – epitélio RS	<i>Retroviridae</i>	<i>Human endogenous retrovirus H-HERV-H/env62</i>	1	E: 5e-80/ I: 189/206 (92 %) / C: 206/208* ⁷
05- soro MG	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Garlic virus A</i>	1	Não encontrado
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tete virus</i>	1	E: 2e-44/ I: 97/100 (97 %) / C: 100/444* ⁸
		<i>Granada virus</i>	1	Não encontrado
		<i>Oxbow virus</i>	1	E: 3e-13/ I: 33/33 (100 %) / C: 33/846* ⁹
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	1	Não encontrado
	<i>Potyviridae</i>	<i>Papaya ringspot virus</i>	1	Não encontrado* ¹⁰
	<i>Reoviridae</i>	<i>Baku virus</i>	1	E: 1e-11/ I: 38/41 (93 %) / C: 41/318
	<i>Retroviridae</i>	<i>Human endogenous retrovirus HERV-K(II)</i>	1	Não encontrado
		<i>Human endogenous retrovirus K113</i>	1	E: 1e-174/ I: 377/399 (94 %) / C: 399/399* ¹¹
		<i>Human endogenous retrovirus H HERV-H/env60</i>	1	Não encontrado
		<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>	1	E: 8e-41/ I: 104/112 (93 %) / C: 112/313
05- soro MG -f*	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Oxbow virus</i>	1	E: 1e-16/ I: 38/38 (100 %) / C: 38/232

	<i>Closteroviridae</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	1	E: 1e-36/ I: 128/151 (85 %) / C: 151/361* ¹²
	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Woodchuck hepatitis virus</i>	1	E: 5e-17/ I: 51/52 (98 %) / C: 52/270
	<i>Potyviridae</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	1	E: 4e-30/ I: 78/82 (95 %) / C: 82/393* ¹³
	<i>Retroviridae</i>	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>	1	E: 2e-40/ I: 104/112 (93 %) / C: 112/583* ¹⁴
	<i>Togaviridae</i>	<i>Sindbis virus</i>	1	Não encontrado
06- soro RS	<i>Retroviridae</i>	<i>Human endogenous retrovirus HML6</i>	1	E: 9e-72/ I: 170/183 (93 %) / C: 183/228
		<i>Human endogenous retrovirus H HERV-H/env60</i>	1	E: 2e-99/ I: 203/210 (100 %) / C: 210/240* ¹⁵

negrito – contig considerado validado pelo alinhamento

* f – apenas com a *read* forward (single end)

*¹ - PREDICTED: *Brachypodium distachyon* 18S ribosomal RNA (planta) (LOC112270327), rRNA- E: 5e-72 / I: 152/152 (100 %) / C: 152/203

*² - *Quercus rubra* plastid, complete genome (planta) - **E: 0.0 / I: 1199/1200 (99 %) / C: 1200/1200**

*³ - *Homo sapiens* BAC clone CTD-2014D7 from 2, complete sequence - **E: 4e-113 / I: 226/226 (100 %) / C: 226/226**

*⁴ - *Homo sapiens* chromosome 17, clone RP11-613C6 - **E: 3e-69 / I: 180/196 (92 %) / C: 196/228**

*⁵ - *Homo sapiens* chromosome 16 clone CH17-12B2 - **E: 1e-134 / I: 267/268 (99 %) / C: 268/269**

*⁶ - *Homo sapiens* BAC clone CH17-288L23 from chromosome unknown, complete sequence - **E: 3e-114 / I: 228/228 (100 %) / C: 228/228**

*⁷ - *Homo sapiens* chromosome 8, clone CTC-497K19, complete sequence - **E: 2e-101 / I: 207/208 (99 %) / C: 208/208**

*⁸ PREDICTED: *Papaver somniferum* 28S ribosomal RNA (LOC113362542), rRNA (papoula) - **E: 6e-179 / I: 345/345 (100 %) / C: 345/444**

*⁹ - *Cucumber* intergenic spacer DNA and 18S rRNA gene (5' region) (planta) - **E: 0.0 / I: 830/846 (98 %) / C: 846/846**

*¹⁰ - *Trifolium repens* voucher Steele 1113 plastid sequence (planta)- **E: 3e-115 / I: 234/236 (99 %) / C: 236/236**

*¹¹ - *Homo sapiens* BAC clone RP11-33P21 from 7, complete sequence - **E: 4e-180 / I: 382/399 (96 %) / C: 399/399**

*¹² - Uncultured eukaryote partial 18S rRNA gene - **E: 0.0 / I: 361/361 (100 %) / C: 361/361**

*¹³ - *Cucumis sativus* hybrid Korean solid green (MGLCC) x Chinese long green (CFND) chloroplast, complete genome (pepino)- **E: 0.0 / I: 392/393 (99 %) / C: 393/393**

*¹⁴ - 5S rRNA {clone pAS5Sa12, tandem repeat} [*Salmo salar*=Atlantic salmon, white muscle, Genomic, 624 nt] - **E: 0.0 / I: 503/506 (99 %) / C: 506/583**

*¹⁵ - *Human* DNA sequence from clone RP5-1198E17 on chromosome 1, complete sequence - **E: 2e-112 / I: 235/240 (98 %) / C: 240/240**

No que se refere aos vírus de DNA, foram classificados vírus gigantes, oncogênicos, fagos, vírus já identificados em seres humanos, peixe, inseto, equino, elefante, plantas e pinguim. No entanto, após o alinhamento apenas os fagos e um vírus de planta foram confirmados, destacados em negrito (tabela 22).

Tabela 22- Demais vírus de DNA classificados por amostra após filtro de 150 pb

Amostra	Família	Vírus	Quantidade de fragmentos após filtro (150 pb)	E-value (E) /identidade (I)/ cobertura (C) do maior contig
01 – epitélio MG	<i>Polydnaviridae</i>	<i>unclassified Bracovirus</i>	1	Não encontrado* ¹
	<i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage PHL095N00</i>	1	E: 1e-116/I: 239/251 (95 %) / C: 251/278
02 – epitélio GO	<i>Adenoviridae</i>	<i>Human mastadenovirus B1/7</i>	7	E: 5e-124/I: 250/254 (98 %) /C: 254/254* ²
		<i>Human mastadenovirus C/5</i>	2	E: 6e-50/I: 129/140 (92 %) /C: 140/188* ³
	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Ranid herpesvirus 1</i>	12	Não encontrado
		<i>Ictalurid herpesvirus 1</i>	2	Não encontrado
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Galleria mellonella MNPV</i>	1	Não encontrado
		<i>Orgyia leucostigma NPV</i>	1	Não encontrado
	<i>Hesperviridae</i>	<i>Equid herpesvirus 2</i>	9	Não encontrado
		<i>Chelonid herpesvirus 5</i>	3	Não encontrado
		<i>Caviid herpesvirus 2</i>	2	Não encontrado
		<i>Elephantid herpesvirus 1</i>	1	Não encontrado
	<i>Myoviridae</i>	<i>Campylobacter phage IBB35</i>	2	Não encontrado
	<i>Nudiviridae</i>	<i>Kallithea virus</i>	4	Não encontrado
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Human papillomavirus type 16</i>	2	E: 4e-18/I: 61/67 (91 %) /C: 67/150
		<i>Human papillomavirus type 82</i>	2	Não encontrado
		<i>Human papillomavirus type 71</i>	1	Não encontrado
	<i>Polydnaviridae</i>	<i>Cotesia congregata bracovirus</i>	50	Não encontrado
		<i>unclassified Bracovirus</i>	11	Não encontrado
		<i>Cotesia sesamiae Kitale bracovirus</i>	3	Não encontrado
		<i>Cotesia sesamiae Mombasa bracovirus</i>	3	Não encontrado
		<i>Cotesia plutellae polydnavirus</i>	1	Não encontrado
<i>Tranosema rostrale ichnovirus</i>		13	Não encontrado	

		<i>Apophua simplicipes ichtnovirus</i>	2	Não encontrado	
		<i>Hyposoter fugitivus ichtnovirus</i>	2	Não encontrado	
		<i>Glypta fumiferanae iviruschno</i>	2	Não encontrado	
Unclassified dsDNA viroses Siphoviridae		<i>Pandoravirus dulcis</i>	24	Não encontrado	
		<i>Pandoravirus salinus</i>	8	Não encontrado	
		<i>Propionibacterium phage PHL070N00</i>	1	E: 1e-109/ I: 213/217 (98 %) /C: 217/217	
		<i>Propionibacterium phage PHL116</i>	1	E: 2e-103/ I: 232/251 (92 %) /C: 251/251	
		<i>Propionibacterium phage PHL132N00</i>	1	E: 7e-38/ I: 142/170 (84 %) /C: 170/241	
		<i>Propionibacterium phage PHL141N00</i>	1	E: 2e-128/ I: 268/283 (95 %) /C: 283/283	
		<i>Propionibacterium phage PHL152M00</i>	1	E: 2e-85/ I: 201/221 (91 %) /C: 221/221	
		<i>Lambdalikevirus</i>	4	E: 0.0/ I: 359/359 (100 %) /C: 359/359	
		Unclassified phages	<i>Escherichia coli O157 typing phage 7</i>	4	Não encontrado
	03- epitélio SC	Herpesviridae	<i>Cercopithecine herpesvirus 5 - Stealth virus 1</i>	4	E: 4e-79/ I: 212/239 (89 %) /C: 239/299* ⁴
Inoviridae		<i>Enterobacteria phage f1</i>	1	E: 4e-126/ I: 238/238 (100 %) /C: 238/238	
Microviridae		<i>Enterobacteria phage phiX174</i>	4	E: 5e-174/ I: 336/341 (99 %) /C: 341/343	
Papillomaviridae		<i>Human papillomavirus type 16</i>	3	E: 2e-42/ I: 109/117 (93 %) /C: 117/695* ⁵	
Polydnviridae		<i>unclassified Bracovirus</i>	1	Não encontrado	
Polyomaviridae		<i>Simian virus 40</i>	1	E: 3e-62/ I: 183/212 (86 %) /C: 212/219* ⁶	
Siphoviridae			<i>Propionibacterium phage PA6</i>	1	E: 2e-93/ I: 216/236 (92 %) /C: 236/237
			<i>Propionibacterium phage ATCC29399B_T</i>	1	E: 1e-173/ I: 381/410 (93 %) /C: 411/410

		<i>Propionibacterium phage</i> <i>PHL070N00</i>	1	E: 5e-125/ I: 273/293 (93 %) /C: 293/303
		<i>Propionibacterium phage</i> <i>PHL116</i>	1	E: 2e-143/ I: 296/310 (95 %) /C: 310/315
		<i>Propionibacterium phage</i> <i>PHL171M01</i>	1	E: 3e-83/ I: 177/187 (95 %) /C: 187/230
		<i>Enterobacteria phage lambda</i>	4	E: 0.0/ I: 8998/8998 (100 %) /C: 8998/9037
04- epitélio RS	<i>Adenoviridae</i>	<i>Human adenovirus 7</i>	1	E: 0.0/ I: 370/375 (98 %) /C: 375/375* ⁷
	<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria phage</i> <i>phiX174 sensu lato</i>	2	E: 3e-94/ I: 216/228 (95 %) /C: 228/236
	<i>Polydnaviridae</i>	<i>Tranosema rostrale ichnovirus</i>	1	Não encontrado
		<i>Cotesia congregata</i> <i>bracovirus</i>	1	Não encontrado
	<i>Siphoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage lambda</i>	2	E: 0.0/ I: 565/565 (100 %) /C: 565/565
05- soro MG	<i>Adenoviridae</i>	<i>Human adenovirus 5</i>	2	E: 1e-55/ I: 135/144 (94 %) /C: 144/1603* ⁸
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Choristoneura occidentalis</i> <i>granulovirus</i>	1	Não encontrado
	<i>Geminiviridae</i>	<i>Tomato leaf curl New Delhi</i> <i>virus</i>	5	E: 0.0/ I: 1417/1418 (99 %) /C: 1418/1694
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cercopithecine herpesvirus 5/ Stealth virus 1</i>	1	Não encontrado
	<i>Inoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage fl</i>	1	E: 0.0/ I: 445/445 (100 %) /C: 445/490
	<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria phage</i> <i>phiX174</i>	1	E: 0.0/ I: 5001/5001 (100 %) /C: 5001/5441
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Human papillomavirus type</i> <i>16</i>	3	E: 1e-43/ I: 110/117 (94 %) /C: 117/1782* ⁹
	<i>Polydnaviridae</i>	<i>Hyposoter fugitivus ichnovirus</i>	1	Não encontrado
		<i>Cotesia congregata</i> <i>bracovirus</i>	1	Não encontrado
	<i>Polyomaviridae</i>	<i>Adelie penguin polyomavirus</i>	1	E: 1e-27/ I: 81/92 (88 %) /C: 92/322

	<i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage P14.4</i>	3	E: 2e-164/ I: 363/392 (93 %) /C: 392/393
		<i>Propionibacterium phage PAD20</i>	2	E: 4e-126/ I: 326/369 (88 %) /C: 369/376
		<i>Propionibacterium phage P100_1</i>	2	E: 4e-135/ I: 287/305 (94 %) /C: 305/305
		<i>Propionibacterium phage PHL082</i>	2	E: 0.0/ I: 451/479 (94 %) /C: 479/479
		<i>Propionibacterium phage PA6</i>	1	E: 3e-107/ I: 235/252 (93 %) /C: 252/252
		<i>Propionibacterium phage P105</i>	1	E: 8e-154/ I: 323/342 (94 %) /C: 342/357
		<i>Propionibacterium phage P1.1</i>	1	E: 3e-42/ I: 138/165 (84 %) /C: 165/305
		<i>Propionibacterium phage ATCC29399B_T</i>	1	E: 1e-96/ I: 208/221 (94 %) /C: 221/256
		<i>Propionibacterium phage PHL112N00</i>	1	E: 2e-98/ I: 204/214 (95 %) /C: 214/214
		<i>Propionibacterium phage PHL009M11</i>	1	E: 2e-118/ I: 247/260 (95 %) /C: 260/262
		<i>Propionibacterium phage PHL025M00</i>	1	E: 1e-84/ I: 185/197 (94 %) /C: 197/211
		<i>Propionibacterium phage PHL092M00</i>	1	E: 8e-93/ I: 208/226 (92 %) /C: 226/226
		<i>Propionibacterium phage PHL171M01</i>	1	E: 9e-115/ I: 208/226 (92 %) /C: 226/226
		<i>Propionibacterium phage PHL199M00</i>	1	E: 8e-89/ I: 227/255 (89 %) /C: 255/257
		<i>Propionibacterium phage PHL301M00</i>	1	E: 6e-92/ I: 331/399 (82 %) /C: 399/399
	-	<i>Pandoravirus salinus</i>	4	Não encontrado* ¹⁰
	-	<i>Pandoravirus dulcis</i>	2	Não encontrado
05- soro MG -f*	<i>Adenoviridae</i>	<i>Human adenovirus 5</i>	2	E: 2e-55/ I:

			135/144 (94 %) /C: 144/1545* ¹¹
<i>Geminiviridae</i>	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	6	E: 0.0/ I: 792/794 (99 %) /C: 794/1466
<i>Herpesviridae</i>	<i>Cercopithecine herpesvirus 5 - Stealth virus 1</i>	2	E: 2e-65/ I: 168/185 (91 %) /C: 185/545* ¹²
	<i>Elephantid herpesvirus 1</i>	1	Não encontrado
<i>Iridoviridae</i>	<i>Chinese giant salamander iridovirus</i>	1	Não encontrado
<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria phage phiX174</i>	1	E: 0.0/ I: 4064/4064 (100 %) /C: 4064/5441*¹³
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Human papillomavirus type 16</i>	1	E: 3e-45/ I: 111/117 (95 %) /C: 117/2344* ¹⁴
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Adelie penguin polyomavirus</i>	1	E: 2e-27/ I: 81/92 (88 %) /C: 92/601
<i>Poxviridae</i>	<i>Monkeypox virus</i>	3	Não encontrado
<i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage P14.4</i>	2	E: 2e-118/ I: 261/280 (93 %) /C: 280/299
	<i>Propionibacterium phage PA6</i>	1	E: 2e-114/ I: 249/262 (94 %) /C: 262/265
	<i>Propionibacterium phage PAD20</i>	1	E: 5e-68/ I: 193/222 (87 %) /C: 222/221
	<i>Propionibacterium phage P1.1</i>	1	E: 3e-42/ I: 138/165 (84 %) /C: 165/291
	<i>Propionibacterium phage ATCC29399B_T</i>	1	E: 4e-157/ I: 352/382 (92 %) /C: 382/382
	<i>Propionibacterium phage PHL030N00</i>	1	E: 5e-108/ I: 221/230 (96 %) /C: 230/230
	<i>Propionibacterium phage PHL092M00</i>	1	E: 8e-93/ I: 208/226 (92 %) /C: 226/226
	<i>Propionibacterium phage PHL141N00</i>	1	E: 7e-108/ I: 234/234 (95 %) /C: 234/234
	<i>Propionibacterium phage PHL301M00</i>	1	E: 2e-75/ I: 185/206 (90 %) /C: 206/216

	-	<i>Pandoravirus salinus</i>	1	Não encontrado
06- soro RS	<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria phage phiX174 sensu lato</i>	1	E: 4e-113/ I: 238/244 (98 %) /C: 244/244
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Human papillomavirus type 16</i>	1	E: 1e-41/ I: 109/117 (93 %) /C: 117/900* ¹⁵
	<i>Polydnaviridae</i>	<i>Cotesia congregata bracovirus</i>	1	Não encontrado

negrito – contig considerado validado pelo alinhamento

* f – apenas com a *read forward* (single end)

*¹ bactéria *Ralstonia solanacearum* de planta. E-value: 3e-34 I: 98/104 (94 %) C: 104/221/ Fagos também foram identificados

*² Human repeated DNA element (Hinf family) - **E-value: 1e-119 I: 250/254 (98 %) C: 254/254**

*³ *Salmo salar* Toll-like receptor 3 (tlr3) gene, complete cds - **E-value: 2e-81 I: 180/185 (97 %) C: 185/188**

*⁴ Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-390B4, complete sequence - **E-value: 2e-107 I: 254/272 (93 %) C: 272/299**

*⁵ Homo sapiens chromosome 5 clone CTB-77B1, complete sequence - **E-value: 0.0 I: 595/615 (97 %) C: 615/695**

*⁶ Homo sapiens BAC clone RP11-548P2 from 2, complete sequence - **E-value: 7e-96 I: 211/219 (96 %) C: 219/219**

*⁷ Human repeated DNA element (Hinf family) sequence - **E-value: 0.0 I: 370/375 (98 %) C: 375/375**

*⁸ - *Salmo salar* IgH locus B genomic sequence (salmão) - **E-value: 0.0 I: 1496/1496 (99 %) C: 1496/1603**

*⁹ - Human gammaherpesvirus 4 isolate HKHD40, partial genome - **E-value: 0.0 I: 1692/1739 (97 %) C: 1739/1782**. Regiões repetitivas em Homo sapiens 3 BAC RP11-117L15 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence - **E-value: 0.0 I: 1690/1739 (97 %) C: 1739/1782**

*¹⁰ - *Salmo salar* EAP30 subunit of ELL complex a (Eap30a (salmão) - **E-value: 7e-77 I: 200/219 (91 %) C: 219/259**

*¹¹ - *Salmo salar* clone BAC 105M10 orphan nuclear receptor Dax-1 (Dax1) gene, complete cds (salmão) - **E-value: 0.0 I: 1420/1427 (99 %) C: 1427/1545**

*¹² - Homo sapiens BAC clone RP11-92K14 from 2, complete sequence - **E-value: 0.0 I: 522/545 (95 %) C: 545/545**

*¹³ - *Staphylococcus xylosus* isolate *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971 genome assembly, chromosome: I **E-value: 0.0 I: 5364/5364 (100 %) C: 5364/5441**

*¹⁴ - *Pongo abelii* BAC clone CH276-65L21 from chromosome 22, complete sequence - **E-value: 0.0 I: 2251/2288 (98 %) C: 2288/2344**

*¹⁵ - Homo sapiens BAC clone RP11-142A22 from 4, complete sequence - **E-value: 0.0 I: 962/990 (97 %) C: 990/1063**

A última da etapa do *pipeline* MetLab que utiliza o FragGeneScan, a partir dos arquivos de saída das sequências não classificadas pelo Kraken, após filtro de 150 pb adicionado nesse trabalho, foram identificadas famílias e gêneros virais conforme tabela 23. Entretanto, após o alinhamento pelo BLASTn dos gêneros virais classificados utilizando o arquivo de saída que lista as sequências nucleotídicas correspondentes aos genes putativos, não foi confirmado nenhum hit com os parâmetros utilizados anteriormente. No entanto, o BLASTn sem selecionar um hit desejado, mostrou alinhamento com sequências de bactérias como *Rhodococcus sp.*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, de humanos (*Homo sapiens*) e plantas.

Tabela 23- Família e gêneros de vírus identificados pelo FragGeneScan por amostra após filtro de 150 pb

Amostra	Família	Gêneros
01	<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirus, Aviadenovirus, Mastadenovirus</i>
	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinivirus</i>
	<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus</i>
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus e Gammabaculovirus</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus, Closterovirus e Crinivirus</i>
	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus, Lymphocryptovirus, Macavirus, Mardivirus, Muromegalovirus, Percavirus, Rhadinovirus, Roseolovirus, Simplexvirus e Varicellovirus</i>
	<i>Hytrosaviridae</i>	<i>Muscavirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus, Megalocytivirus e Ranavirus</i>
	<i>Marseillevirus family</i>	-
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Nimaviridae</i>	<i>Whispovirus</i>
	<i>Ophioviridae</i>	<i>Ophiovirus</i>
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Deltapapillomavirus, Dyodeltapapillomavirus, Dyoepsilonpapillomavirus, Dyoetapapillomavirus, Dyoiotapapillomavirus, Dyozetapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Etapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus, Omegapapillomavirus, Omikronpapillomavirus, Pipapillomavirus, Psipapillomavirus, Rhopapillomavirus, Sigmapapillomavirus, Thetapapillomavirus Upsilonpapillomavirus, Xipapillomavirus e Zetapapillomavirus</i>

	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Chlorovirus, Coccolithovirus, Ichnovirus, Phaeovirus, Prasinovirus e Prymnesiovirus</i>
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Kobuvirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Avipoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus e Yatapoxvirus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>
02	<i>Adenoviridae</i>	<i>Aviadenovirus, Atadenovirus, Mastadenovirus e Siadenovirus</i>
	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinivirus</i>
	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus, Carlavirus, Foveavirus, Mandarivirus, Lolavirus e Potexvirus</i>
	<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>
	<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus</i>
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus e Betabaculovirus</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Hantavirus e Orthobunyavirus</i>
	<i>Caliciviridae</i>	<i>Lagovirus, Norovirus e Vesivirus</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus e Crinivirus</i>
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus, Iltovirus, Lymphocryptovirus, Macavirus, Mardivirus, Muromegalovirus, Percavirus, Rhadinovirus, Roseolovirus, Simplexvirus e Varicellovirus</i>
	<i>Hytrosaviridae</i>	<i>Muscavirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus e Ranavirus</i>
	<i>Marseillevirus family</i>	-
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Nimaviridae</i>	<i>Whispovirus</i>
	<i>Ophioviridae</i>	<i>Ophiovirus</i>
	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Ampelovirus, Chlorovirus, Coccolithovirus, Phaeovirus e Prasinovirus</i>
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Aphthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Cosavirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Orthoturdivirus, Paraturdivirus, Parechovirus, Sapelovirus, Teschovirus e Tremovirus</i>
	<i>Pneumoviridae</i>	<i>Pneumovirus</i>
	<i>Polydnviridae</i>	<i>Ichnovirus</i>
	<i>Potyviridae</i>	<i>Bymovirus, Macluravirus, Potyvirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Avipoxvirus, Betaentomopoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus e Yatapoxvirus</i>
	<i>Retroviridae</i>	<i>Alpharetrovirus e Lentivirus</i>
	<i>Totiviridae</i>	<i>Leishmaniavirus</i>

03	<i>Virgaviridae</i>	<i>Pecluvirus</i>
	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinivirus</i>
	<i>Asfarviridae</i>	<i>Asfivirus</i>
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus e Gammabaculovirus</i>
	<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus e Ranavirus</i>
	<i>Marseillevirus family</i>	-
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Narnaviridae</i>	<i>Mitovirus</i>
	<i>Ophioviridae</i>	<i>Ophiovirus</i>
	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>
	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Phaeovirus, Chlorovirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>
	<i>Retroviridae</i>	<i>Gammaretrovirus e Deltaretrovirus</i>
	04	<i>Iridoviridae</i>
<i>Mimiviridae</i>		<i>Mimivirus</i>
<i>Ophioviridae</i>		<i>Ophiovirus</i>
<i>Phycodnaviridae</i>		<i>Chlorovirus e Phaeovirus</i>
<i>Polydnaviridae</i>		<i>Ichnovirus</i>
<i>Potyviridae</i>		<i>Ipomovirus</i>
<i>Retroviridae</i>		<i>Lentivirus</i>
05	<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirus, Aviadenovirus e Mastadenovirus</i>
	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinivirus</i>
	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus, Lolavirus, Mandarivirus e Potexvirus</i>
	<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus</i>
	<i>Asfarviridae</i>	<i>Asfivirus</i>
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus e Gammabaculovirus</i>
	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus e Foveavirus</i>
	<i>Bromoviridae</i>	<i>Anulavirus, Bromovirus, Cucumovirus e Oleavirus</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>
	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>
	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus e Caulimoviridae</i>
	<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus, Closterovirus e Crinivirus</i>
	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus, Betacoronavirus e Gammacoronavirus</i>
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>
	<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus e Marburgvirus</i>
	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus, Mastrevirus e Topocuvirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus, Iltovirus, Lymphocryptovirus, Macavirus, Mardivirus, Muromegalovirus, Percavirus, Rhadinovirus, Roseolovirus,</i>

		<i>Simplexvirus e Varicellovirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus, Megalocytivirus e Ranavirus</i>
	<i>Luteoviridae</i>	<i>Polemovirus e Polerovirus</i>
	<i>Marseillevirus family</i>	-
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Nanoviridae</i>	<i>Nanovirus</i>
	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Rubulavirus e Thogotovirus</i>
	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Chlorovirus, Coccolithovirus, Phaeovirus e Prasinovirus e Prymnesiovirus</i>
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Aphthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Cosavirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Orthoturdivirus, Paraturdivirus, Parechovirus, Sapelovirus, Teschovirus e Tremovirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Avipoxvirus, Betaentomopoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus e Yatapoxvirus</i>
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Aquareovirus, Orthoreovirus, Phytoreovirus, Rotavirus e Seadornavirus</i>
	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus, Ephemerovirus, Lyssavirus, Novirhabdovirus, Nucleorhabdovirus, Varicosavirus e Vesiculovirus</i>
	<i>Retroviridae</i>	<i>Alpharetrovirus, Deltaretrovirus, Gammaretrovirus e Lentivirus</i>
	<i>Secoviridae</i>	<i>Cheravirus</i>
	<i>Solemoviridae</i>	<i>Sobemovirus</i>
	<i>Tymoviridae</i>	<i>Tymovirus</i>
	<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i>
	<i>Virgaviridae</i>	<i>Furovirus, Pecluvirus e Pomovirus</i>
05-f*	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinivirus</i>
	<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>
	<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus</i>
	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus, Betabaculovirus e Deltabaculovirus</i>
	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>
	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus, Closterovirus e Crinivirus</i>
	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus e Betacoronavirus</i>
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus, Lymphocryptovirus, Macavirus, Muromegalovirus, Percavirus, Rhadinovirus e Varicellovirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Chloriridovirus, Iridovirus, Lymphocystivirus, Megalocytivirus e Ranavirus</i>
	<i>Kitaviridae</i>	<i>Cilevirus</i>

	<i>Marseillevirus</i> family	-
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Ophioviridae</i>	<i>Ophiovirus</i>
	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Deltapapillomavirus, Dyoiotapapillomavirus, Dyodeltapapillomavirus, Dyoepsilonpapillomavirus, Dyoetapapillomavirus, Dyozetapapillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Etapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Kappapapillomavirus, Lambdapapillomavirus, Mupapillomavirus, Nupapillomavirus, Omegapapillomavirus, Omikronpapillomavirus, Pipapillomavirus, Psipapillomavirus, Rhopapillomavirus, Sigmampapillomavirus, Thetapapillomavirus, Upsilonpapillomavirus, Xipapillomavirus, Zetapapillomavirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Avipoxvirus, Betaentomopoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus e Yatapoxvirus</i>
	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Chlorovirus, Coccolithovirus, Phaeovirus e Prasinovirus e Prymnesiovirus</i>
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Aphthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Cosavirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Orthoturdivirus, Paraturdivirus, Parechovirus, Sapelovirus, Teschovirus e Tremovirus</i>
	<i>Poxviridae</i>	<i>Avipoxvirus, Betaentomopoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus e Yatapoxvirus</i>
	<i>Retroviridae</i>	<i>Gammaretrovirus</i>
	<i>Secoviridae</i>	<i>Cheravirus, Comovirus e Nepovirus</i>
	<i>Solemoviridae</i>	<i>Sobemovirus</i>
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>
	<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i>
	<i>Virgaviridae</i>	<i>Furovirus</i>
06	<i>Baculoviridae</i>	<i>Alphabaculovirus</i>
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Lymphocryptovirus, Macavirus, Percavirus e Rhadinovirus</i>
	<i>Iridoviridae</i>	<i>Lymphocystivirus e Ranavirus</i>
	<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>
	<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Chlorovirus, Phaeovirus e Prasinovirus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>

* f – apenas com a *read forward* (single end)

A composição final do viroma após as avaliações de qualidade descritas anteriormente constituiu de uma (1) família de RNA e quatro famílias (4) de DNA. O *Senecavirus A* foi o único vírus de RNA considerado e no que tange aos vírus de DNA, foram considerados fagos e um vírus de tomate, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, na amostra 05, conforme descrito na tabela 24.

Tabela 24- Contigs encontrados por amostra (total e do SVA)

Amostra	Família RNA	Vírus RNA	Família DNA	Vírus DNA
01- epitélio MG	<i>Picornaviridae</i>	<i>Senecavirus A</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage PHL095N00</i>
02- epitélio GO	<i>Picornaviridae</i>	<i>Senecavirus A</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage PHL070N00</i> <i>Propionibacterium phage PHL116</i> <i>Propionibacterium phage PHL132N00</i> <i>Propionibacterium phage PHL141N00</i> <i>Propionibacterium phage PHL152M00</i> <i>Lambdalikevirus</i>
03- epitélio SC	<i>Picornaviridae</i> - -	<i>Senecavirus A</i> - -	<i>Inoviridae</i> <i>Microviridae</i> <i>Siphoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage f1</i> <i>Enterobacteria phage phiX174</i> <i>Propionibacterium phage PA6</i> <i>Propionibacterium phage ATCC29399B_T</i> <i>Propionibacterium phage PHL070N00</i> <i>Propionibacterium phage PHL116</i> <i>Propionibacterium phage PHL171M01</i> <i>Enterobacteria phage lambda</i>
04 -epitélio RS*	<i>Picornaviridae</i> -	<i>Senecavirus A</i> -	<i>Microviridae</i> <i>Siphoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage phiX174 sensu lato</i> <i>Enterobacteria phage lambda</i>
05- soro MG**	<i>Picornaviridae</i> - -	<i>Senecavirus A</i> - -	<i>Geminiviridae</i> <i>Inoviridae</i> <i>Microviridae</i> <i>Siphoviridae</i>	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> <i>Enterobacteria phage f1</i> <i>Enterobacteria phage phiX174</i> <i>Propionibacterium phage P14.4</i> <i>Propionibacterium phage PAD20</i> <i>Propionibacterium phage P100_1</i> <i>Propionibacterium phage PHL082</i> <i>Propionibacterium phage PA6</i> <i>Propionibacterium phage P105</i> <i>Propionibacterium phage ATCC29399B_T</i> <i>Propionibacterium phage PHL112N00</i>

Propionibacterium phage PHL009M11
Propionibacterium phage PHL025M00
Propionibacterium phage PHL092M00
Propionibacterium phage PHL171M01
Propionibacterium phage PHL199M00
Propionibacterium phage PHL301M00
Propionibacterium phage P1.1
Propionibacterium phage PHL030N00
Propionibacterium phage PHL141N00

06 - soro RS

Microviridae

Enterobacteria phage phiX174 sensu lato

* considerado pela detecção por linha de comando

** *single e pair-end*

Em relação ao *Senecavirus A* (SVA), as amostras 01, 02, 03 e 05 (single end) foram as que encontraram sequências de nucleotídeos do SVA. A amostra de pool de epitélio de SC (3) teve uma recuperação considerável do genoma completo (6725 pb), restando aproximadamente 555 pb para seu fechamento. Esses resultados foram obtidos tanto usando o Kraken do MetLab e também por alinhamento com linhas de comando no terminal frente à referência NC_011349.1 (protótipo SVV-001) (tabela 25).

A amostra 04, entretanto, não apresentou detecção do SVA pelo MetLab, mas apresentou dois (2) contigs do SVA em relação à referência por alinhamento e detecção/quantificação absoluta por PCR digital (tabela 12 e 25). As amostras 01 a 05 também obtiveram prévia detecção do SVA por PCR digital (tabela 12).

Além disso, os contigs do SVA das amostras 01 a 03 em relação à referência foram apresentados pelo programa Circos presente no *pipeline* VirAmp da plataforma Galaxy e pelo programa R para cada uma das amostras detectadas (figura 32).

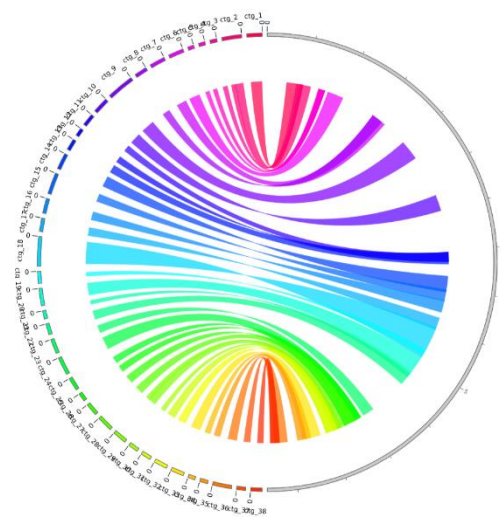
Tabela 25- Número de contigs encontrados por amostra (total e do SVA)

Bibliotecas	Contigs	#contigs gt70	#contigs gt70 <i>Senecavirus A</i>	Maior sequência <i>Senecavirus A</i>
01- epitélio MG	28877	26048	29	428
02- epitélio GO	335366	259815	41	939
03- epitélio SC	2382	2315	31	6725

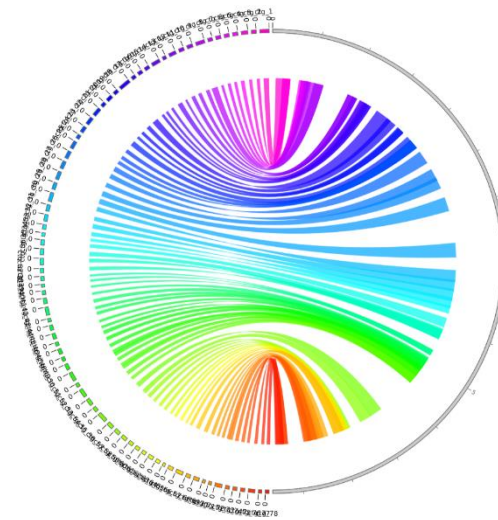
04 -epitélio RS	1123	1063	2	84
05- soro MG	26654	23151	0	-
05- soro MG -f*	34.005	21169	02	255
06 - soro RS	1053	978	0	-

contigs gt70 – maiores que 70 pb

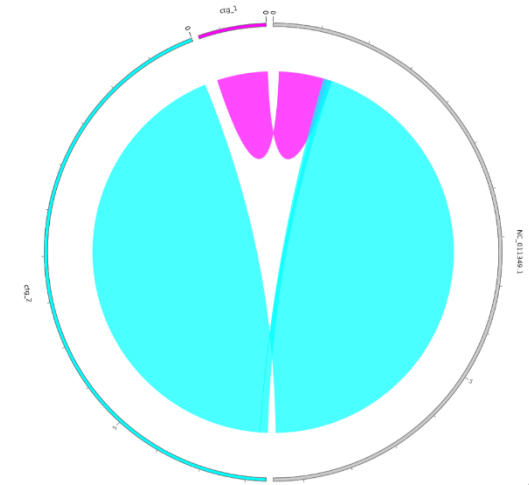
*f – apenas com a *read* forward (single end)



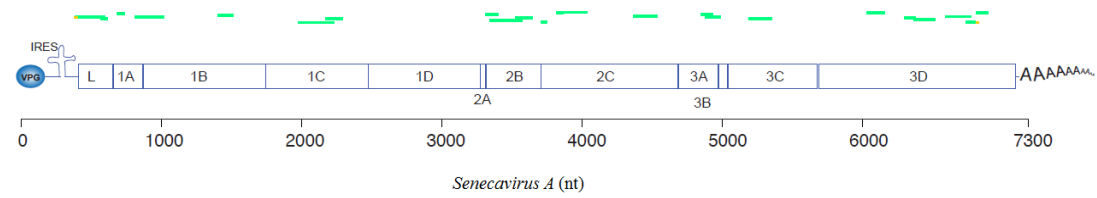
A.1



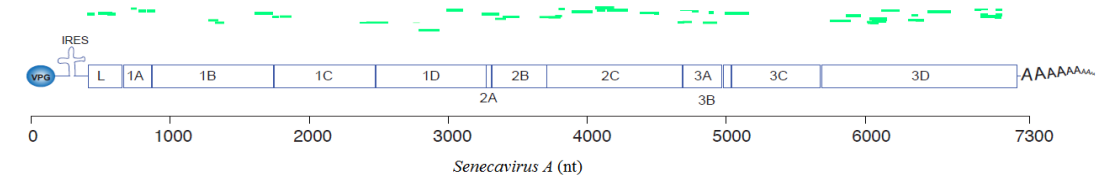
B.1



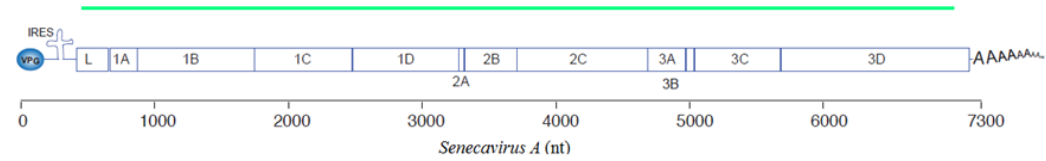
C.1



A.2



B.2



C.2

Figura 32 – Contigs do *Senecavirus A* encontrados por amostra em relação à referência NC_011349.1 do SVA de forma circular (1) pelo Circos da plataforma Galaxy e linear (2) pelo programa R. **A a C**, amostras 01 a 03, respectivamente.

5.6 Inferências filogenéticas

O alinhamento do maior *contig* (6725 nt) da amostra 03 (epitélio SC) montado pelo Spades presente no MetLab foi realizado com 117 sequências do genoma completo do SVA disponíveis no Genbank. Os contigs das amostras 01 e 02 e 05 single não foram alinhados nessa etapa por não compartilharem uma região em comum com sinal filogenético ou ainda por serem sequências pequenas, como no caso da amostra 04.

Na análise do sinal filogenético do maior contig montado da amostra 03 (epitélio SC) frente a 117 sequências do genoma completo do *Senecavirus A*, apenas 0,2 % dos táxons das sequências não tiveram suas topologias agrupadas. Isso demonstra que estes conjuntos de dados apresentam forte sinal filogenético (figura 33).

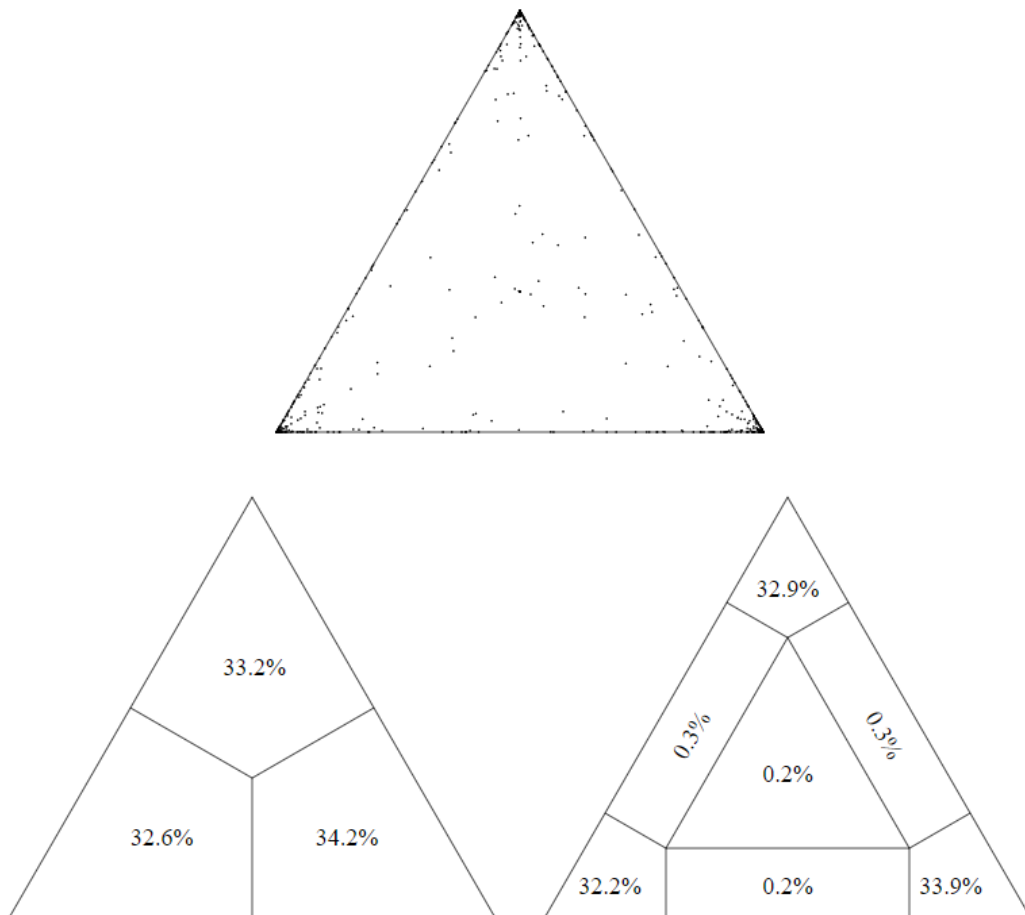


Figura 33 – Análise do sinal filogenético da amostra 03 (epitélio SC) frente a 117 sequências do genoma completo do *Senecavirus A* utilizando o software Tree-Puzzle 5.3.

Na análise de saturação, não houve saturação das substituições em todas as sequências analisadas e a frequência de transição foi maior do que a transversão (figura 34).

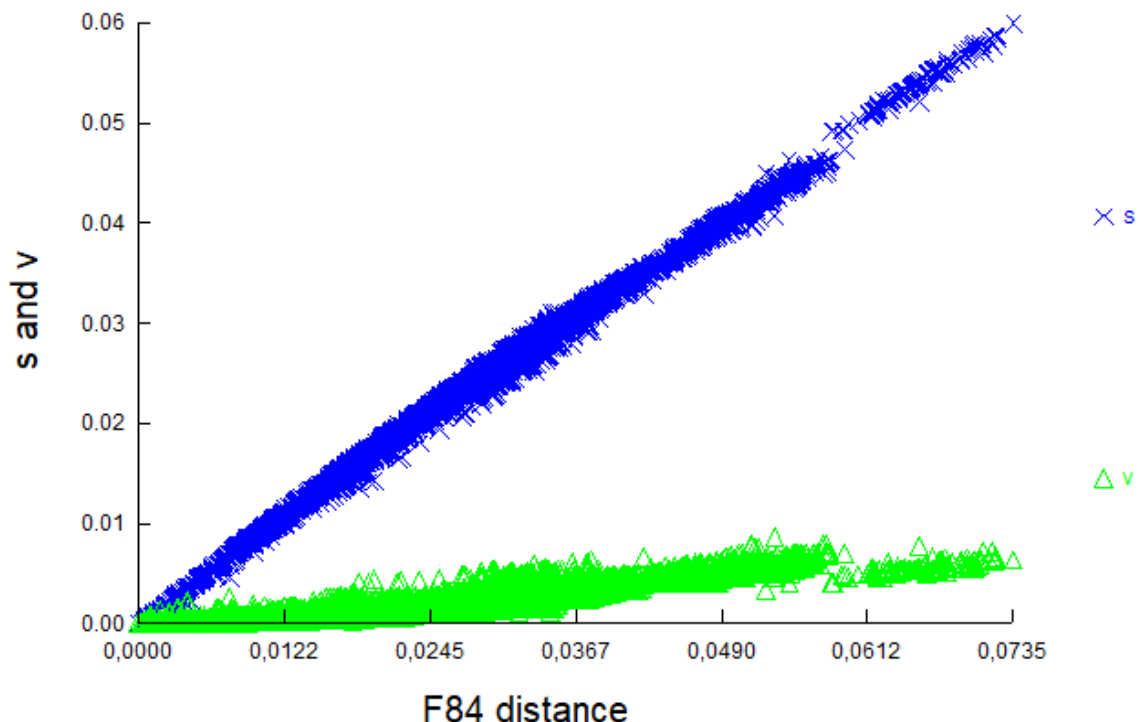


Figura 344 – Análise de saturação pelo software DAMBE a partir da sequência alinhada do maior contig da amostra 03 (epitélio SC) com 117 sequências do genoma completo do SV-A. Em verde, é representado as taxas de transversão, em azul as de transição *versus* a distância filogenética (eixo x).

O modelo ideal para construção das árvores foi o Tamura-Nei com distribuição Gamma e regiões invariáveis (TN93+G+I). A figura 38 apresenta a tabela gerada na escolha do melhor modelo a partir de sequências alinhadas do maior contig da amostra 03 (epitélio SC) com as do genoma completo do SVA.

5.6.5 Reconstrução de árvores

A análise filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança (figuras 39 e 40) obteve elevados valores de bootstrap (acima de 70). A amostra 03 de epitélio de SC do presente estudo se agrupou no clado das amostras brasileiras. As primeiras sequências do SVA (NC 011349.1, KU954086 e DQ641257) referentes ao ano de 2008 foram agrupadas e

dispostas mais distantes das demais e foram utilizadas como raiz na árvore. Além disso, houve um agrupamento das amostras, em sua maioria, de acordo com o país de origem, no entanto, em alguns casos como nas sequências da China e Estados Unidos, estas foram distribuídas em mais de um clado ou dentro de um mesmo clado (figuras 35 e 36).



Figura 35 – Árvore reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (MEGA 7.026) com 1000 réplicas de Bootstrap utilizando o modelo Tamura-Nei com distribuição Gamma e regiões invariáveis (TN93+G+I) a partir de sequências do genoma completo do SVA. O triângulo e a seta vermelhos apresentam a amostra 03, de epitélio de SC, da presente tese e o clado em amarelo, sequências brasileiras.

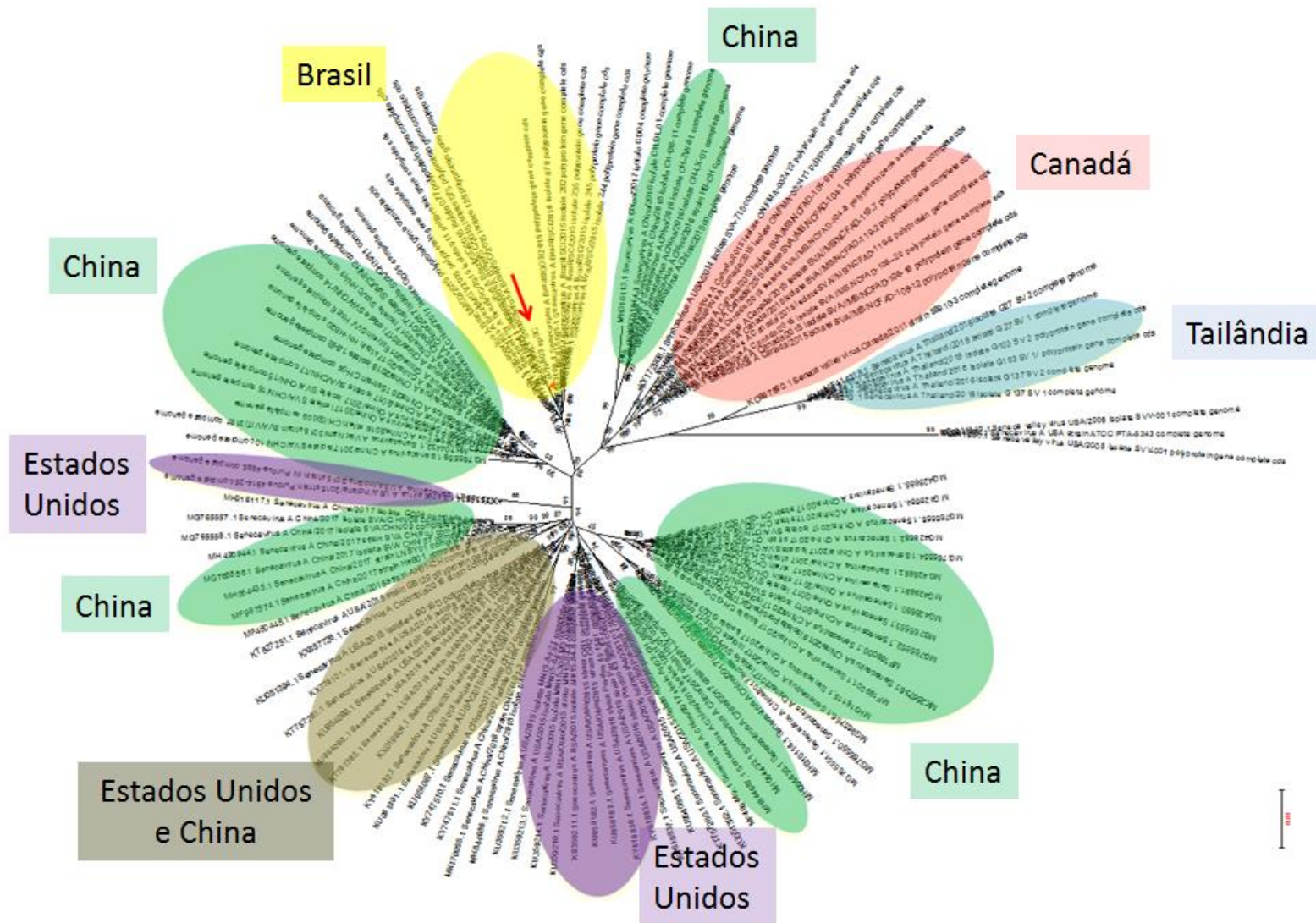


Figura 36– Árvore reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (MEGA 7.0.26) com 1000 réplicas de Bootstrap a partir de sequências do genoma completo do SVV. A seta vermelha apresenta a amostra 03, de epitélio de SC da presente tese. A figura apresenta também os táxons referentes às sequências do genoma completo do SVV da China (verde), Brasil (amarelo), Canadá (rosa), Tailândia (azul), Estados Unidos (roxo), Estados Unidos e China (marron).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O isolamento viral do *Senecavirus A* (SVA) é descrito em células de suíno e células tumorais humanas. Bracht et al. (2016) descreveram o isolamento viral do SVA a partir de amostras de tecidos de suínos contendo lesões vesiculares, obtidos em 2007, em linhagens celulares contínuas de rim de suíno (SK6 e IBRS2). Suspensão de líquido vesicular de suíno pertencente ao surto brasileiro ocorrido em 2015 foi inoculada em células de rim de suíno (PK15) alcançando o isolamento do SVA após duas passagens cegas (Leme et al., 2015).

Em nosso estudo, no entanto, o isolamento viral só foi obtido em célula tumoral humana (NCI-H1299), após cinco passagens cegas. Nas demais células utilizadas como a PK15, MDBK, VERO e BHK21, nenhum efeito citopático foi observado. Até o presente momento, foi exitoso o isolamento a partir de três (3) amostras biológicas (epitélio), pertencentes aos estados de MG, GO e RS.

Para detecção do RNA viral do SVA, métodos moleculares como a PCR convencional (Laguardia-Nascimento et al., 2016), PCR em tempo real (Bracht et al., 2016; Dall Agnol et al., 2017; Fowler et al., 2017), hibridização *in situ* (RNAscope) (Resende et al., 2017), nested-PCR (Feronato et al., 2017) e o sequenciamento paralelo massivo (Vannucci et al., 2015) estão disponíveis e vem sendo utilizados desde o ano de 2015. No entanto, a transcrição reversa seguida da PCR digital em gotas (RT-ddPCR) foi desenvolvida e padronizada para a detecção e quantificação absoluta tanto do SVA quanto do FMDV, de maneira inédita, no presente trabalho.

A RT-ddPCR para o vírus da Febre Aftosa foi a primeira PCR digital padronizada neste estudo (Pinheiro de Oliveira et al., 2018). Esta tecnologia serviu de modelo na padronização da RT-ddPCR para o *Senecavirus A*, objeto maior deste estudo, devido ao fato de ambos os vírus pertencerem à mesma família e compartilharem, portanto, o mesmo tipo e organização do material genético (RNA). Outro ponto relevante que justificou a padronização da RT-ddPCR para o FMDV foi o fato de nosso grupo não possuir o SVA isolado no início do desenvolvimento desta tese. Este entrave inicial trouxe o benefício do desenvolvimento do ensaio para os dois vírus, visto que eles estão na lista da triagem obrigatória quando da ocorrência de enfermidades vesiculares, as quais possuem sinais clínicos indistinguíveis.

A primeira etapa da padronização da RT-ddPCR (*one-step* e *two-step*), a qual envolveu o uso da sonda de duplo *quencher* (ZEN™) (para SVA) e o gradiente de temperatura (SVA / FMDV) foi crucial para alcançar a melhor separação entre as gotas

positivas e negativas. Além disso, foi importante para reduzir o *background* das gotas negativas na reação da RT-ddPCR *one-step* para SVA.

Muldrew e Lovett (2013) demonstraram que a sonda de duplo *quencher* contendo o ZEN™ diminuiu o *background* de fluorescência e aumentou a sensibilidade da qPCR para o monitoramento da carga viral do *BK polyomavirus* (BKV), quando comparado com a mesma sonda, no entanto, com um único *quencher*. O uso da sonda de duplo *quencher* também foi realizado na padronização da ddPCR para quantificação da toxina Shiga produzida pela *Escherichia coli* e os autores verificaram que após essa etapa de padronização, a ddPCR mostrou resultados similares na quantificação do DNA com a qPCR (Verhaegen et al., 2016).

Nas RT-ddPCR padronizadas para SVA e FMDV, o gradiente de temperatura auxiliou na escolha da temperatura que permitisse o maior e mais estável número de gotas totais geradas que são requeridas na distribuição de Poisson para quantificação absoluta. Taylor et al. (2015) também demonstraram melhor separação entre as gotas negativas e positivas e a máxima amplitude de fluorescência quando o gradiente de temperatura foi realizado na PCR digital em gotas para vírus da Influenza A (H1N1) (amostras H275-WT e H275Y-MUT).

As RT-ddPCR padronizadas para FMDV e SVA foram consideradas sensíveis, com limite de detecção na ordem de fg, quando utilizado plasmídeo pUCIDT Kan-SVA e quando utilizado como molde o RNA dos vírus alvos, detectaram baixa carga viral. No caso da RT-ddPCR para FMDV, detectou-se até 1,00 TCID₅₀ ou 10^{1.4} TCID₅₀/mL. Sharma et al. (2015) reportaram resultados similares de sensibilidade (10^{1.7} TCID₅₀/mL) para o FMDV sorotipo A quando utilizaram um ensaio de qPCR multiplex utilizando sonda Taq-Man. A RT-ddPCR para a detecção do FMDV desenvolvida no presente trabalho foi 1000 vezes mais sensível que o ensaio de imunocromatografia lateral (*lateral flow strip using monoclonal antibodies anti-FMDV*), para rápida detecção do antígeno e sorotipagem de diferentes FMDV, o qual detectou 10³ até 10⁴ TCID₅₀ do antígeno (Morioka et al., 2015).

Embora a RT-ddPCR para FMDV tenha mostrado a mesma sensibilidade analítica da RT-qPCR para esse mesmo alvo, aquela permitiu uma quantificação absoluta das amostras sem a necessidade de curvas padrão. Estudos prévios compararam a sensibilidade analítica da RT-ddPCR e RT-qPCR para HIV-1 (Henrich et al. (2012), BK vírus (poliomavírus) (Bateman et al., 2017) e Enterovirus 71 (Lui; Tan, 2014) e também relataram resultados similares de sensibilidade analítica entre PCR cinética e PCR digital.

Quando a sensibilidade analítica foi avaliada nas técnicas moleculares para SVA, ambos os ensaios em *one-step* (RT-ddPCR e RT-qPCR) tiveram limites similares e elevados

de detecção que os ensaios moleculares em *two-step*. As técnicas moleculares em *one-step* foram consideradas altamente sensíveis, detectando pequenas quantidades do SVA ($10^{0,87}$ TCID₅₀/ mL ou 0,185 TCID₅₀ ou 7,41 partículas virais/ mL) e quando o plasmídeo foi utilizado, o limite de detecção foi de 0,1 fg.

Feronato et al. (2017) desenvolveram uma nested-PCR para amplificar a região codificadora parcial da VP1 do SVA e encontraram também um elevado limite de detecção, na ordem de fg, detectando até 36,2 fg (0,0181 ng/ μ L ou 18,1 fg/ μ L) do RNA total do SVA isolado. No entanto, esse limite foi 300 vezes menor do que o da RT-ddPCR para SVA *one-step* padronizada por nosso grupo, com destaque para o fato de que o ensaio de PCR nested traz o risco maior de contaminação do ambiente de trabalho com *amplicons*, o que é minimizado com o uso da RT-ddPCR em *one-step*.

Resende et al. (2017) mostraram um limite de detecção similar ao aqui apresentado, detectando até 0,562 TCID₅₀ do SVA, quando utilizado a RT-qPCR para a VP1 do vírus. Embora a sensibilidade analítica da RT-qPCR *one-step* para SVA deste trabalho foi a mesma da RT-ddPCR *one-step*, o resultado de especificidade analítica da RT-qPCR foi diferente, pois este detectou o DNA do *Vaccinia virus* nas três triplicatas, embora com elevado valor de CT, que é considerado como amostra "suspeita" no LFDA-MG. A RT-ddPCR *one-step*, em contrapartida, não detectou nenhum dos 15 vírus causadores de enfermidades vesiculares, detectando somente o SVA, indicando assim a alta especificidade do ensaio.

A RT-ddPCR para FMDV, apresentou os mesmos resultados de especificidade analítica que os encontrados na RT-qPCR para FMDV, quando avaliados os diferentes vírus causadores de enfermidades vesiculares. Somente os três sorotipos do FMDV (O, A e C) (Malirat *et al.*, 2007) foram detectados, sendo os ensaios moleculares considerados específicos.

Basu (2017), em um artigo de revisão, compararam cinco instrumentos da PCR digital que particionam a amostra em câmaras isoladas fisicamente ou em gotas. Os autores descreveram que a PCR digital em gotas possui vantagens que inclui a capacidade de gerar mais partições na amostra, as quais permitem a detecção de alvos raros mesmo quando a amostra possui inibidores. De uma forma geral, na PCR digital, a partição aumenta a eficiência de amplificação e permite resistência a inibidores.

A RT-qPCR para beta-actina demonstrou que a extração dos materiais genéticos e a síntese de cDNA foram eficientes, uma vez que amplificou todas as amostras utilizadas nos testes de especificidade diagnóstica. Além disso, no que tange aos testes de especificidade em

cinquenta (50) amostras negativas, tanto a RT-ddPCR para SVA quanto a RT-ddPCR para FMDV não amplificaram nenhuma das amostras negativas, o que reforça a especificidade das técnicas. Além disso, todas as amostras positivas do último surto de Febre Aftosa, ocorrido no Brasil, foram amplificadas e quantificadas pelas RT-ddPCR (21,2–7300 cópias de RNA por 20 µL), o que confirma também a especificidade da técnica e sua sensibilidade, uma vez que o teste detectou desde 21 cópias de RNA.

A respeito da aplicação da PCR digital em gotas com a finalidade de quantificar HIV em amostras clínicas, trabalhos têm mostrado que este ensaio é mais sensível que a PCR em tempo real, mas menos específico em casos de amostras com baixos números de cópias de RNA. Destacando-se a dificuldade de determinar o *cut-off* entre gotas negativas e positivas, Jones et al. (2014) utilizaram um modelo de HIV para propor um novo *pipeline* de bioinformática para analisar os alvos nas amostras com baixo número de cópias, evitando resultados falsos positivos. De forma diferente, no presente trabalho, a definição do *cut-off* foi alcançada pela utilização de um considerável número de amostras negativas, o que foi uma etapa crucial na padronização, uma vez que 16 % das amostras (RT-ddPCR para SVA) ou 22 % (RT-ddPCR para FMDV) apresentaram algumas gotas em amplitudes abaixo do controle positivo.

Além de fornecer duas novas ferramentas diagnósticas para o FMDV e SVA, a padronização dos ensaios moleculares deste trabalho foi importante para aplicação da RT-ddPCR para SVA nas amostras a serem utilizadas no viroma do presente trabalho, cujo objetivo principal é a análise do viroma, a fim de quantificá-las de forma absoluta. Essa detecção/quantificação absoluta foi realizada em paralelo com a RT-qPCR e as técnicas apresentaram considerável concordância (94,2 %). No entanto, quando as amostras biológicas se consistiam em *pools* de soro suíno, a RT-ddPCR para a detecção/quantificação do SVA se mostrou mais eficiente do que a RT-qPCR, detectando um *pool* a mais, proveniente do estado de Minas Gerais. O *pool* não detectado na RT-qPCR e sim na RT-ddPCR apresentou a menor concentração de RNA do SVA (34 cópias/ µL) que os demais detectados, o que sugere uma maior sensibilidade da RT-ddPCR frente à PCR em tempo real, embora os testes de sensibilidade analítica tenham-se mostrado semelhantes em ambas as técnicas, quando utilizado plasmídeo ou RNA viral.

Uma provável hipótese seria de que algum inibidor presente no *pool* de soros impactou a RT-qPCR e não o fez no caso da RT-ddPCR. Desde o desenvolvimento da PCR em tempo real, trabalhos têm mostrado o efeito de inibidores contidos em amostras biológicas

diversas (Schrader et al, 2012), incluindo o sangue total, onde a hemoglobina é considerado um dos inibidores importantes, e que pode estar presente também no soro hemolizado (Abu Al-Soud; Rådström, 2000). Trabalho conduzido pelo mesmo grupo para análise de inibidores em plasma de seres humanos (Abu Al-Soud et al., 2000), evidenciaram após centrifugação, que todas as frações do sangue, incluindo papa de leucócitos, plasma, plaquetas e hemácias contém inibidores para as polimerases. Utilizando a cromatografia para a separação dos inibidores, estes autores apontaram a IgG como o principal inibidor dentre os avaliados em amostras biológicas de plasma. O presente trabalho conduziu as avaliações em soro, porém, a única diferença deste fluido biológico para o plasma, é que o soro não contém fibrinogênio, portanto, os resultados apontados da IgG como inibidor poderiam ser estendidos para o presente trabalho.

A PCR digital é uma adaptação da PCR em tempo real e possui um potencial para ser aplicada no diagnóstico viral (Jones et al., 2014). Essa tecnologia foi desenvolvida para aumentar a precisão na detecção de moléculas alvos (Hindson et al., 2011). Na PCR em tempo real, curvas padrões são requeridas e com isso a quantificação relativa e indireta é alcançada (Miotke et al., 2014), suscitando preocupações sobre *threshold* e eficiência da reação.

De acordo com Hayden et al. (2013), a quantificação absoluta realizada pela PCR digital em gotas (ddPCR) possui vantagens econômicas, uma vez que a compra de calibradores necessários para curva padrão não é necessária. Outra vantagem da ddPCR é a elevada resistência a inibidores em alguns tipos de amostras (Gutierrez-Aguirre et al., 2015).

Rački et al. (2014) utilizaram a RT-ddPCR para analisar vírus de RNA em amostras de água e evidenciaram que tal ferramenta foi capaz de quantificar baixas cópias de vírus. Eles trabalharam com amostras de efluente e água residual, que apresentam normalmente quantidade moderada de inibidores para PCR em tempo real, mostrando que a RT-ddPCR teve desempenho na detecção de vírus na presença de substâncias interferentes de PCR.

As seguintes amostras biológicas são suficientes para estabelecer o diagnóstico de febre aftosa e outras enfermidades vesiculares: epitélio, líquido esofágico-faríngeo, leite, sangue (OIE, 2017) e líquido vesicular. A resistência da ddPCR a inibidores é uma vantagem em destaque, porque os tipos de amostras recebidos em laboratórios de diagnóstico para enfermidades vesiculares são complexas e contém inibidores que podem persistir, mesmo após etapas de tratamento prévio a fim de eliminá-los. As RT-ddPCRs padronizadas neste estudo foram importantes, especialmente em casos em que a RT-qPCR detecta amplificação

com altos valores de *cycle threshold* (CT), o que muitas vezes sugere uma amplificação inespecífica da RT-qPCR (Paixão *et al.*, 2008).

A quantificação de ácidos nucleicos extraídos é frequentemente encontrada em trabalhos de metagenômica (Morgan *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2015; Josefsen *et al.*, 2015; Kohl *et al.*, 2015). Nessa abordagem, métodos com elevada precisão de quantificação como a PCR em tempo real e a PCR digital têm sido utilizados (Hall *et al.*, 2014; Josefsen *et al.*, 2015; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015). Nesse sentido, outra relevante importância da RT-ddPCR evidenciada neste estudo foi a seleção de amostras para realização da metagenômica viral a partir dos dados de quantificação absoluta.

A análise de metagenômica viral identificou bactérias, em sua maioria, e vírus nas amostras da presente tese, além de considerada quantidade de sequências não classificadas ao aplicar o *pipeline* MetLab. A composição do viroma atribuída, inicialmente, ao MetLab incluiu 19 famílias de vírus de RNA e 21 de DNA. Após o filtro de 150 pb, adicionado entre as etapas de montagem e classificação taxonômica, houve uma redução desses números para 13 e 14, respectivamente. Porém, com a curadoria manual a fim de avaliar os contigs classificados por meio de alinhamento aplicando mais de um critério (e-value, identidade/similaridade, cobertura e avaliação da região da sequência), os números reduziram drasticamente para uma (1) família de vírus de RNA classificada (*Picornaviridae*) e cinco (5) famílias de vírus de DNA, envolvendo um grande número de fagos (*Inoviridae*, *Microviridae*, *Polydnviridae* e *Siphoviridae*), além de uma espécie de vírus de planta (*Geminiviridae*).

As famílias *Siphoviridae* e *Picornaviridae* foram as mais predominantes nas amostras do surto, sendo classificadas em cinco (5) das seis (6) amostras. A família *Microviridae* foi classificada em quatro (4) amostras, a *Inoviridae* em duas (2) e *Geminiviridae* em uma. Curiosamente, as amostras de soro apresentaram fagos e no caso da amostra de soro de MG (5) apresentou também o *Tomato leaf curl New Delhi virus*, vírus de tomate, tanto nas análises *pair-end* quanto em *single-end*.

De acordo com os formulários de coleta das amostras, observou-se que os animais cujas amostras de soro foram coletadas, apresentaram sintomas clínicos de 3 a 4 dias (amostra 05 – soro MG) e de 7 a 10 dias (amostra 06 – soro RS). No entanto, não há descrição de óbito nesses animais que eram fêmeas com idade entre 8 a 20 meses. Um fator negativo dessa etapa é que as amostras não tiveram um controle na coleta, o que pode acarretar em contaminações bacterianas decorrentes da manipulação em condições não estéreis. Além disso, poderia explicar os achados curiosos de fagos no soro ou ainda do *Tomato leaf curl New Delhi virus*.

No que se refere aos fagos, as amostras de soro e epitélio apresentaram a maioria desses vírus relacionado com a bactéria *Propionibacterium*, que também foi classificada nas amostras do estudo e é descrita no epitélio de alguns animais como suínos (Oomi et al., 2002) e seres humanos (bactéria de pele) (Liu et al., 2015). Além deles, foram classificados fagos de *Enterobacteria* como *Enterobacteria phage f1* e *Enterobacteria phage phiX174* que infectam *E.coli*, bactéria também classificada no presente estudo. Skaradzińska et al. (2017) isolaram 17 bacteriófagos de fazendas de suínos da Polônia (diferentes ambientes e fezes) e testaram em amostras de *E. coli* confirmando que todos eles foram ativos contra as amostras de *E. coli* testadas causando lise em 1,9% a 57,7% delas.

O único vírus de RNA identificado e confirmado por alinhamento e ainda relacionado a enfermidades vesiculares foi o *Senecavirus A* (SVA), encontrado em cinco (5) das seis (6) amostras do presente estudo. Entretanto, houve uma discordância entre os resultados de detecção pela PCR digital e o viroma na amostra de epitélio do RS (4).

A amostra 4, constituída de um pool de 4 indivíduos apresentou entre 3.400 a > 2.000.000 cópias/ μ L de RNA do SVA por RT-ddPCR, exceto um animal que foi negativo. O MetLab, por outro lado, não detectou o SVA, no entanto, dois (2) contigs com fragmentos menores que 80 pb foram encontrados por linhas de comando. A quantificação absoluta por RT-ddPCR reforça a especificidade dos dois contigs encontrados por linha de comando. Acredita-se que a discordância no sequenciamento paralelo massivo pode ser decorrente de algum erro durante o processo de preparação das bibliotecas até o sequenciamento.

Embora a metagenômica viral não tenha sido realizada em amostras de animais sem suspeita de enfermidade vesicular, clinicamente saudáveis, como também não realizado por Vannucci et al. (2015) trabalhando com amostras brasileiras, trabalhos de outros grupos utilizando a metagenômica viral em suínos não tem encontrado o SVA, principalmente em amostras de suínos saudáveis (Shan et al., 2011; Amimo et al., 2016; Theuns et al., 2016; Denner, 2017; Blomström et al., 2018; Chen et al., 2018).

A amostra 05 de soro suíno de MG apresentou a detecção do SVA por PCR digital e pelo viroma quando avaliada em *single-end* sugerindo viremia. Apesar da estratégia *single* não ser tão robusta que a *pair-end* que permite a montagem, os animais que constituíram o pool (fêmeas com 8 meses de idade), apresentavam sintomas clínicos de enfermidades vesiculares que duraram de 3 a 4 dias.

Vannucci et al. (2015) identificaram também o SVA em soro suíno revelando potencial viremia nos animais infectados. Fernandes et al. (2018) compararam a viremia no

soro de suínos inoculados com amostra de SVA histórica (SVV 001) uma contemporânea (SD15-26) e observaram que os níveis de viremia detectados nos animais foram superiores quando utilizada a amostra contemporânea. Maggioli et al. (2018) avaliaram viremia em amostras de soro de suíno com 15 semanas de idade por RT-qPCR e isolamento e detectaram o RNA do SVA no soro de todos os animais infectados entre os dias 3 e 7 pós inoculação (p.i.), com níveis máximos de viremia sendo detectados no dia 3 p.i. Além disso, os autores mostram que a infecção pelo SVA provoca respostas de células T, com os níveis de anticorpo por neutralização viral e respostas de células T CD4⁺ paralelas à redução de viremia e resolução da doença. As células T CD8⁺ específicas para SVA são detectados mais tarde durante a infecção.

O *Tomato leaf curl New Delhi virus* encontrado também na amostra de soro, pertencente à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, representa uma restrição importante para a produção de tomate e nos últimos anos, vem ampliando a gama de hospedeiros devido ao vetor de transmissão (Moriones et al., 2017). Esse vírus é transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci* (ordem *Hemiptera*, família *Aleyrodidae*) de forma circulante e persistente (Rosen et al., 2015).

Os resultados do alinhamento, utilizando o BLASTn (NCBI), do contig classificado, indicaram valores estridentes confirmando a presença do material genético do vírus em questão. No entanto, apareceram outros geminivírus de diferentes espécies como melão, luffa e folha de abóbora, embora com valores menores de cobertura e identidade.

No Brasil, as doenças mais importantes causadas por geminivírus são aquelas que afetam o feijoeiro e o tomate causado principalmente pelo *Bean golden mosaic virus* (Inoue-Nagata et al., 2016). No entanto, outras culturas como quiabo, pimenta, batata, soja e batata-doce podem ser infectadas por geminivírus no Brasil, mas as perdas econômicas não são substanciais ou generalizadas (Inoue-Nagata et al., 2016). Por se tratar de um dado ainda isolado, por não haver mais informações referentes ao tipo de alimentação dos animais, mas que geralmente envolvem milho, trigo ou soja ou ainda se na granja, onde a amostra foi coletada havia alguma plantação, há uma limitação na interpretação desse dado em questão, o que sugere testes futuros a fim de se investigar os geminivírus em suínos. Mas acredita-se que a presença desse vírus no soro possa ser devido às condições de coleta discutidas anteriormente nessa seção.

A abordagem metagenômica viral em suínos envolvidos em surtos de enfermidades vesiculares neste estudo identificaram além do *Senecavirus A*, outros vírus como fagos e vírus

de planta e ainda bactérias, embora não relevantes para o contexto de doenças vesiculares. Em nosso estudo, a plataforma utilizada foi o HiSeq. O maior número de sequências encontradas foi de bactérias, o que poderia explicar também os achados virais em maior quantidade de fagos.

Vannucci et al. (2015) realizaram o sequenciamento paralelo massivo pela plataforma MiSeq (Illumina, EUA) em amostras também provenientes de surtos de enfermidades vesiculares ocorridos em 2014 e obtiveram o genoma completo do *Senecavirus A* e sequências de bactérias como *Bradyrhizobium*, *E. coli*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* e de um fago (*Salmonella phage*) que foram removidas antes da etapa de montagem. No entanto, nenhum outro vírus foi encontrado.

Ao analisar cada etapa do *pipeline* MetLab utilizado, observa-se inicialmente por meio das análises e gráficos do PRINSEQ que o sequenciamento paralelo massivo realizado pelo HiSeq obteve profundidade acima de 2.000.000 de *reads* e no máximo em torno de 69.000.000 (números de *reads* totais). A plataforma HiSeq, embora com custo maior se comparada à plataforma MiSeq, obtém um rendimento maior de *reads* geradas (Caporaso et al., 2012). As sequências, em sua maioria, apresentaram boa qualidade atribuída aos elevadores valores de *Phred score*, exceto na amostra de soro de suíno de MG (5) que obteve *reads* ruins em um dos sentidos da fita (antisense). No entanto, todo *pipeline* foi rodado com a amostra 05 em *pair* e *single-end* a fim de comparação e na tentativa de melhor recuperação dos dados.

No que se refere a etapa de eliminação do material genético do hospedeiro, realizada pelo Bowtie, nota-se que a quantidade de *reads* de suíno foi abaixo de 8 % em todas as amostras. Esse resultado demonstra que a utilização do kit de extração de ácidos nucleicos que tem um rendimento puro do material genético extraído pelo uso de beads magnéticas foi uma escolha assertiva. Além disso, houve pouca manipulação das amostras nessa etapa por se tratar de um extrator automático e por último o resultado da baixa quantidade de *reads* do hospedeiro pode ser também atribuído a uma etapa de eliminação de DNA adicionada previamente à transcrição reversa, pelo uso de DNase.

O sucesso de um viroma depende de fatores como qualidade do material genético extraído, do processo de preparação da biblioteca, do rendimento, cobertura e profundidade do sequenciamento além dos programas de análise utilizados (Green; Keller, 2006; Kohl et al., 2015; Lindgreen et al., 2016). Outro fator relevante é que o sucesso deste processo de análise de dados obtidos do viroma é atualmente limitado pelo fato de que muitos vírus ainda

não foram caracterizados e não estão incluídos em bases de dados de referência viral, o que impossibilita avaliar a precisão da classificação (Woolhouse et al., 2008). Essa afirmativa é observada na presente tese, principalmente devido ao elevado número de sequências não classificadas após a classificação taxonômica. Ainda, pode-se citar que, as *reads* geradas pelas técnicas de sequenciamento paralelo massivo têm taxas de erro, algumas das quais podem causar mudanças de estrutura e dificultar ainda mais a previsão de regiões codificadoras de proteína (Rho et al., 2010).

O FragGeneScan, último programa utilizado pelo MetLab, a fim de recuperar sequências virais a partir dos arquivos de sequências não classificadas pelo Kraken, identificou famílias e gêneros virais. Segundo Rho et al. (2010), o FragGeneScan usa critérios de tamanho para previsão de fragmento de gene de pelo menos 60 pb, ou seja, 20 aminoácidos. Além disso, o fragmento necessita ter 50-100% de sobreposição com o gene verdadeiro na leitura para ser considerado como um verdadeiro positivo. No entanto, nenhum hit foi confirmado por alinhamento pelo Blastn, utilizando os critérios conjuntos propostos neste trabalho, sendo desconsiderado na interpretação final.

Ao se fazer o alinhamento a partir dos contigs classificados pelo Kraken ou FragGeneScan sem definir um hit de interesse no BLASTn (NCBI), muitas sequências foram alinhadas com bactérias com valores de e-value, cobertura e identidade estridentes. Hesse et al. (2017) mencionam que pode haver uma superestimação de genes bacterianos em sequências virais identificadas erroneamente, atribuída a contaminações de DNA, em particular quando as amostras foram obtidas de matrizes ambientais complexas.

Essa etapa de acurácia dos resultados por parte do usuário é de extrema importância. Trabalhos de viroma envolvendo amostras de suínos relacionados com doenças entéricas ou respiratórias utilizam e-value como critério de confirmação pelo Blast dos contigs encontrados (Shan et al., 2011; Theuns et al., 2016). Outros além do e-value propõem a avaliação da identidade (Amimo et al., 2016; Blomström et al., 2018). Chen et al. (2018) ao utilizar a análise de metagenômica viral em amostras de fezes de suíno propõem que a validação dos contigs classificados pelo Kraken seja confirmado por outro programa no nível de proteína (Kaiju program). Além disso, recomenda um cut-off de 80 % de similaridade e 70 % de cobertura ao se utilizar o Blast. A amplificação por PCR também foi utilizada a fim de implementar um controle de qualidade na confirmação dos vírus de DNA e RNA caracterizados em amostras clínicas (Bal et al., 2018).

No presente trabalho, o controle de qualidade dos contigs iniciou com um filtro por tamanho de nucleotídeos (150 pb) adicionado entre as etapas de montagem e classificação taxonômica, que resultou em uma diminuição do número de falso positivos. Após a classificação, os táxons classificados foram avaliados por meio de alinhamento (BLASTn) frente ao vírus em questão e geral (sem selecionar um hit de interesse) otimizado para sequências altamente similares. A interpretação do conjunto de dados (e-value, similaridade-identidade e avaliação da região se é repetitiva, conservada, etc) foi realizada de forma simultânea baseando-se em valores estridentes. Por último, o *Senecavirus A* teve amplificação prévia por PCR (PCR digital) nas amostras do surto submetidas ao viroma.

Após o sequenciamento paralelo massivo, a amostra de *pool* de epitélio de SC (3) teve uma recuperação considerável do genoma completo (6725 pb), restando aproximadamente 555 pb para seu fechamento. As demais amostras que possuíram contigs do *Senecavirus A* (1, 2, 4 e 5-*single*) não foram submetidas a filogenia, por não compartilharem regiões comuns com sinal filogenético.

A análise do sinal filogenético é uma medida da dependência estatística entre os valores das características das espécies, devido as suas relações filogenéticas e, considerada uma etapa recomendada contra interpretações do processo evolutivo e precedida de inferências filogenéticas (Revell et al., 2008). Os resultados da filogenia utilizando a amostra três (3) juntamente com sequências do genoma completo indicaram confiança na separação dos clados atribuídos aos elevados valores de bootstrap. O maior número de sequências do SVA na árvore é proveniente da China.

As primeiras sequências do SVA depositadas no Genbank (2008) foram agrupadas mais distantes das demais sequências e com isso enraizadas. Leme et al. (2017) classificaram amostras do SVA em três clados temporais baseados em sua virulência, características e distribuição geográfica, utilizando sequências da VP1 do vírus. O clado I contém a primeira sequência depositada, SVV-001; o clado II, amostras de SVA que circularam nos Estados Unidos entre 1988 e 1997 e são considerados com pouca ou nenhuma patogenicidade para suínos e, por último, o clado III que inclui amostras de SVA isoladas de 2001 a 2016 que são associadas a doenças vesiculares. No presente estudo, de forma semelhante, foi possível visualizar a separação de dois clados, sendo os das amostras históricas e o das contemporâneas, provenientes dos surtos de 2015 a 2018. As amostras de 1988 e 1997 não foram utilizadas por não possuírem o genoma completo depositado. Fernandes et al. (2018) discutem que as diferenças na amostra contemporânea (SD15-26) são decorrentes de

múltiplas alterações nucleotídicas envolvendo as regiões 5' e 3' UTRs e a ORF longa que codifica para a poliproteína.

A sequência do SVA consenso obtida da amostra de epitélio de SC (3) na presente tese, proveniente de 04 indivíduos (suínos) se agrupou com outras sequências brasileiras formando um clado, o que sugere uma possível origem genética comum e uma diferença genética com outros isolados do SVA de diferentes regiões. Laguardia-Nascimento et al. (2016), ao calcular as distâncias genéticas entre os isolados indicaram que o vírus possa ter derivado de uma fonte comum, uma vez que são geneticamente similares e pertencem a um clado de baixa divergência. Além disso, os autores sugerem que o vírus provavelmente esteve presente no Brasil em 2014 a partir de cálculos de análise bayesiana, reforçada por comunicações pessoais de especialistas na área.

Leme et al. (2019) ao analisar uma sequência brasileira parcial da VP1 do SVA (535 pb), proveniente do Paraná, em um foco ocorrido em 2018, também encontrou similaridades variando de 97,3 % - 97,7 % com as amostras brasileiras de SVA já depositadas e o agrupamento em um único clado. Os autores apontam que, de forma curiosa, nos surtos recentes ocorridos no Brasil em 2018 (envolvendo sete estados brasileiros), dos quais receberam amostras para diagnóstico, a doença parece apresentar manifestações clínicas mais graves em relação às observadas em 2015.

As sequências presentes na árvore apresentada (Figura 40) se agruparam de acordo com o país de origem em sua maioria, no entanto, em alguns casos como a China e os Estados Unidos, as sequências foram agrupadas em mais de um clado ou dentro de um mesmo clado. A China importa anualmente um número considerável de suínos reprodutores dos Estados Unidos e trabalhos como Wang et al. (2018) por meio de análises de recombinação afirmam que há uma recombinação genética ocorrendo com o SVA na China.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo também com os obtidos por Saeng Chuto et al. (2018) em que as sequências da Tailândia se encontram em um clado separado e mais próximo das sequências do Canadá. Saeng Chuto et al. (2018) afirmam que o SVA presente na Tailândia compartilha o mesmo ancestral com sequências do Canadá, embora não se pode confirmar que a origem da introdução do SVA na Tailândia foi pelo Canadá. Os autores acreditam que o SVA poderia ter estado na Tailândia por muito tempo, mas não foram detectados devido à presença de outros patógenos causando doenças clínicas semelhantes, incluindo FMDV.

Nesse sentido, a metagenômica viral e a PCR digital demonstraram ser ferramentas úteis a serem aplicadas em situações de surtos de enfermidades vesiculares que impactam o agronegócio nacional. Nossos achados corroboram juntamente com os trabalhos surgidos ao longo da execução da tese de que o *Senecavirus A* é o único agente causador dos surtos de doença vesicular nos suínos ocorridos no Brasil no período da coleta. Os surtos continuam ocorrendo e, dessa forma, o presente trabalho reforça a importância das técnicas aqui desenvolvidas e padronizadas. Além disso, a presente tese elucida pontos importantes a serem avaliados de forma criteriosa e em conjunto (controle de qualidade com vários parâmetros) ao se deparar com trabalhos envolvendo dados massivos como a metagenômica viral.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O isolamento viral foi efetuado somente em célula de carcinoma de pulmão humano (NCI-H1299) a partir de amostras pertencentes a 4 estados brasileiros no ano de 2015 (MG, GO, RS, SC).
- Duas novas tecnologias de quantificação absoluta, RT-ddPCR para FMDV e para SVA, foram disponibilizadas na presente tese.
- Na etapa de padronização dessas novas ferramentas, os testes de gradiente de temperatura, o uso da sonda de duplo quencher e de amostras negativas foram cruciais.
- O *Senecavirus A* foi detectado em 30 das 79 (37,97 %) amostras avaliadas por RT-ddPCR. O vírus foi encontrado em quatro (4) de cinco (5) estados envolvidos no surto (MG, SC, RS e GO).
- Em relação ao viroma, o SVA foi o único agente viral detectado nas amostras (epitélio e soro) relacionado a um quadro de enfermidade vesicular. Foram encontrados também fagos especialmente relacionados à *Propionibacterium* (bactéria de pele) e de *Enterobacteria* em amostras de epitélio e soro.
- A presente tese permitiu a padronização e disponibilização de ferramentas inovadoras e promissoras a serem utilizadas em situações de surto, bem como na vigilância epidemiológica de agentes virais em espécies animais de importância no cenário nacional. Além disso, subsídio à implementação de técnicas para fortalecer os programas de controle sanitário nos LFDAs-MAPA.

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

- Aprofundamento da curadoria manual dos dados obtidos, para a produção de um artigo robusto sobre os achados de viroma aqui descritos.
- Sequenciamento do genoma completo do SVA para realização da Epidemiologia Molecular a partir dos isolados obtidos.
- A partir do sequenciamento do SVA dos isolados virais, analisar os contigs obtidos pelo sequenciamento paralelo massivo, para fortalecimento do uso desta ferramenta em análise de materiais clínicos, visto que em todo o mundo os diferentes grupos de pesquisa ainda discutem a falta de um pipeline mais robusto para viroma, a ocorrência de falso-positivos e a necessidade da compreensão do uso de contigs de menor tamanho.

*Produção científica e participação
de eventos e cursos*

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CURSOS

9.1 Produção científica

9.1.1 - Papers e manuscritos:

9.1.1.1. Laguardia-Nascimento M, Gasparini MR, Sales ÉB, Rivetti AV, Sousa NM, Oliveira AM, Camargos MF, **Pinheiro de Oliveira TF**, Gonçalves JPM, Madureira MC, Ribeiro DP, Marcondes IV, Barbosa-Stancioli EF, Fonseca AA: Molecular epidemiology of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. *Vet J* **2016**, 216:207–209 (**D.O.I.** 10.1016/j.tvjl.2016.08.013).

9.1.1.2. **Pinheiro de Oliveira, TF**; Fonseca Junior, AA; Camargos, MF; Laguardia-Nascimento, M; Oliveira, AM; Cottorello, AC; Goes-Neto, A; Barbosa-Stancioli, EF. Diagnosis of Foot-and-mouth disease vírus by droplet digital PCR, *Virol Methods*. **2018** Sep;259:129-134. (**D.O.I.** 10.1016/j.jviromet.2018.06.015)

9.1.1.3. **Pinheiro de Oliveira, TF**; Fonseca Junior, AA; Laguardia-Nascimento, M; Camargos, MF; Giannattasio-Ferraz, S; Cottorello, AC; Oliveira, AM; Barbosa, AAS; Goes-Neto, A; Barbosa-Stancioli, EF. Reverse Transcriptase Droplet Digital PCR to identify the emerging vesicular virus, Senecavirus A, in biological samples. *Transboundary and Emerging Diseases*, **2019** Mar 12, p.1-10 (**D.O.I.** 10.1111/tbed.13168)

9.1.2 - Resumos apresentados em Congressos:

9.1.2.1. **Pinheiro de Oliveira, TF**; Laguardia-Nascimento, M; Gasparini, MR; Sales, EB; Rivetti Jr, AV; Sousa, NM; Oliveira, AM; Camargos, MF; Goncalves, JPM; Madureira, MC; Ribeiro, DP; Marcondes, IV; da fonseca, FG; Barbosa-Stancioli, EF; Fonseca Junior, AA. Senecavirus A (Seneca Valley Virus 1): Primeiro Relato no Brasil de Doença Vesicular em Suínos. In: 2 Simpósio de Microbiologia da UFMG- Microbiologia Translacional - Do Ambiente Natural às Aplicações Biotecnológicas, 2015, Belo Horizonte. *Microbiologia Translacional - Do Ambiente Natural às Aplicações Biotecnológicas*. Belo Horizonte: Programa de Pós Graduação em Microbiologia, **2015**. p. 45-45 (**resumo / pôster**)

9.1.2.2. **Pinheiro de Oliveira, TF**; Fonseca Junior, AA; Camargos, MF; Laguardia-Nascimento, M; Orzil, LL; Oliveira, AM; Cottorello, AC; Goes-Neto, A; Barbosa-Stancioli, EF. Padronização de PCR digital para o diagnóstico do vírus da Febre Aftosa (FMDV- Foot-and-mouth disease virus). In: III Simpósio de Microbiologia da UFMG - Doenças Microbianas Emergentes, Belo Horizonte. SIM III, **2016** (**resumo / pôster**). **Este trabalho foi premiado por relevância acadêmica, tendo sido apresentação oralmente.**

9.1.2.3. **Pinheiro de Oliveira, TF**; Fonseca Junior, AA; Laguardia-Nascimento, M; Camargos, MF; Cottorello, AC; Oliveira, AM; Barbosa, AAS; Goes-Neto, A; Barbosa-Stancioli, EF. Standardization of Digital PCR for Senecavirus A, an Emerging Virus from Picornaviridae. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia. XII Encontro de Virologia do Mercosul, **2017** (**resumo / pôster**)

9.1.2.4 **Pinheiro de Oliveira, TF**; Santos, MA; Camargos, MF; Fonseca Junior, AA; Goes-Neto, A; Barbosa-Stancioli, EF. A predictive alignment-free model based on a new logistic regression-based method for feature selection in complete and partial sequences of Senecavirus A, X-Meeting - 13th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C), **2017 (resumo / pôster)**

9.1.2.5 **Pinheiro de Oliveira, TF**; Thomaz, M. M.; Fonseca Junior, A. A.; Leocadio, V. A. T.; Oliveira, A. M.; Goes-Neto, A.; Barbosa-Stancioli, E. F.; Camargos, M. F. Verificação de desempenho do ensaio de neutralização viral para *Senecavirus A*” In: “V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas”, **2018 (resumo / pôster)**

9.2 Participação em Eventos

9.2.1. X-Meeting - 13th *International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C)*. 2017

9.2.2. RSG Brazil - 2st *Student Council Symposium*. 2017.

9.2.3. I Curso de Verão em Bioinformática. 2017.

9.2.4. Seminário Internacional - Operações de Unidades de Biossegurança Níveis III e IV. 2016.

9.2.5. RSG Brazil - 1st *Student Council Symposium*. 2016.

9.2.6. III Simpósio de Microbiologia da UFMG - Doenças Microbianas Emergentes. 2016.

9.2.7. X- Meeting 2016 - 12th *International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C)*. 2016.

9.2.8. II Simpósio de Microbiologia da UFMG. 2015.

9.2.9 Protein Day. 2015. UFMG

9.3 Cursos realizados

9.3.1. **2017** - Metagenômica: da aquisição à mineração de dados. (Carga horária: 70h). Universidade Estadual Paulista, UNESP, Brasil.

9.3.2. **2017** - Curso Internacional de Bioinformática em Epidemiologia Molecular e Evolução Viral, CIBEMEV, ICB/UFMG

9.3.3. **2016** - Introdução ao Linux. (Carga horária: 20h). Secretaria de Estado de Ciência Tecnologia e Ensino Superior, SECTES, Brasil.

9.3.4. **2016** - Ferram. de Bioinformática Aplicadas às Análises de Sequências de RNA-SEQ. (Carga horária: 80h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Brasil.

9.3.5. **2016** - Curso Teórico de Boas Práticas em Cultura de Células. (Carga horária: 20h). Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, Brasil.

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

- ABPA, 2018. **Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA)**. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 22 de jan de 2019
- ABACHIN, E. et al. **Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid**. *Biologicals*. v. 52, p. 49-54, 2018. doi: 10.1016/j.biologicals.2018.01.001.
- ABU AL-SOUD, W.; RÅDSTRÖM, P. **Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat**. *J Clin Microbiol*. [s.l.], v.38, n° 12, p. 4463-70, 2000. ISSN: 0095-1137.
- ABU AL-SOUD, W.A.; JÖNSSON, L.J.; RÅDSTRÖM, P. **Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR**. *J Clin Microbiol*. [s.l.], v.38, n° 01, p. 345-50, 2000. ISSN: 0095-1137.
- AFGAN, E. et al. **The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update**. *Nucleic Acids Res*. v. 44, n° W1, p.W3-W10, 2016. doi: 10.1093/nar/gkw343.
- AIGRAIN, L.; GU, Y.; QUAIL, M. A. **Quantitation of next generation sequencing library preparation protocol efficiencies using droplet digital PCR assays - a systematic comparison of DNA library preparation kits for Illumina sequencing**. *BMC genomics*, [s.l.], v. 17, p. 458, 2016. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/s12864-016-2757-4.
- ALEXANDERSEN, S.; OLEKSIEWICZ, M. B.; DONALDSON, A. I. **The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR**. *The Journal of General Virology*, [s.l.], v. 82, n° Pt 4, p. 747–755, 2001. ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/0022-1317-82-4-747.
- ALVES, J. M. P. et al. **GenSeed-HMM: A Tool for Progressive Assembly Using Profile HMMs as Seeds and its Application in Alpavirinae Viral Discovery from Metagenomic Data**. *Frontiers in Microbiology*, [s.l.], v. 7, p. 269, 2016. ISSN: 1664-302X, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00269.
- AMBROSE, H. E.; CLEWLEY, J. P. **Virus discovery by sequence-independent genome amplification**. *Reviews in Medical Virology*, [s.l.], v. 16, n° 6, p. 365–383, 2006. ISSN: 1052-9276, DOI: 10.1002/rmv.515.
- AMERICO, J. L.; EARL, P. L.; MOSS, B. **Droplet digital PCR for rapid enumeration of viral genomes and particles from cells and animals infected with orthopoxviruses**. *Virology*, [s.l.], v. 511, p. 19–22, 2017. ISSN: 1096-0341, DOI: 10.1016/j.virol.2017.08.005.
- AMGARTEN, D. et al. **Marvel: A pipeline for recovery and analysis of viral genomes from metagenomic shotgun sequencing data**. X-meeting. 2017.

AMIMO, J.O. et al. **Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa.** *Arch Virol*, v.161, n°4, p.887-97, 2016. doi: 10.1007/s00705-016-2819-6.

ARVIA, R. et al. **Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 246, p. 15–20, 2017. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.04.003.

ARZT, J. et al. **First Detection and Genome Sequence of Senecavirus A in Vietnam.** *Microbiol Resour Announc*, v.8, n° 3, 2019. pii: e01247-18. doi: 10.1128/MRA.01247-18.

BARTOLINI, L. et al. **Detection of HHV-6 and EBV and Cytokine Levels in Saliva From Children With Seizures: Results of a Multi-Center Cross-Sectional Study.** *Front Neurol*. v. 9, p. 834, 2018. doi:10.3389/fneur.2018.00834. eCollection 2018.

BASU, A. S. **Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR.** *SLAS technology*, [s.l.], v. 22, n° 4, p. 369–386, 2017. ISSN: 2472-6311, DOI: 10.1177/2472630317705680.

BATEMAN, A. C. et al. **Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard.** *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 63, n° 3, p. 761–769, 2017. ISSN: 1530-8561, DOI: 10.1373/clinchem.2016.265512.

BATISTA, L. et al. **Validation of Serum Samples Pooling Efficacy in Regards to the Diagnosis of PRRS Virus by Elisa and qRT-PCR.** Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, v.2, 2006. Abstract. .

BERNARD, V. et al. **Circulating Nucleic Acids Associate with Outcomes of Patients with Pancreatic Cancer.** *Gastroenterology*. pii: S0016-5085(18)35006-6. 2018. doi: 10.1053/j.gastro.2018.09.022.

BRASIL.2004. **Instrução Normativa n° 47, de 18 de Junho de 2004.** Aprova o regulamento técnico do programa nacional de sanidade suídea. Publicado no Diário Oficial da União de 23/06/2004. Seção 1, p. 64. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7938>>. Acesso em 10 de Nov de 2017.

BRASIL. 2007. **Instrução Normativa n° 44, de 2 de outubro de 2007.** Aprova as diretrizes gerais para a Erradicação e a Prevenção da Febre Aftosa. Publicado no Diário Oficial da União n° 191, 3 de outubro de 2007, seção 1, p. 2-10. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/instrucao-normativa-mapa-no-44-de-02-de-outubro-de-2007.pdf/view>. Acesso em 17 de Nov de 2017.

BRASIL, 2009. **Plano de ação para febre aftosa**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2009. 96 p.

BRASIL, 2013. **Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/Listadoencomasanimaisdenotificacaoobrigatoria.pdf>>. Acesso em: 10 de nov de 2017.

BRASIL, 2014. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publica orientações sobre estomatite vesicular**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/07/ministerio-publica-orientacoes-sobre-estomatite-vesicular>>. Acesso em: 07 de out de 2015.

BELÁK, S. et al. **New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches**. *Veterinary Microbiology*, [s.l.], v. 165, nº 1–2, p. 95–101, 2013. ISSN: 1873-2542, DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.022.

BENTLEY, D. R. et al. **Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry**. *Nature*, [s.l.], v. 456, nº 7218, p. 53–59, 2008. ISSN: 1476-4687, DOI: 10.1038/nature07517.

BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. **Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus**. *Veterinary Microbiology*, [s.l.], v. 83, nº 1, p. 1–10, 2001. ISSN: 0378-1135.

BIELANSKI, A. et al. **Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring**. *Theriogenology*, [s.l.], v. 71, nº 3, p. 499–508, 2009. ISSN: 0093-691X, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.015.

BIO-RAD. **Droplet Digital PCR Applications Guide**. USA. 106p. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf>. Acesso em: 27 de abr de 2017.

BLOMSTRÖM et al. **Characterisation of the Virome of Tonsils from Conventional Pigs and from Specific Pathogen-Free Pigs**. *Viruses*, v. 10, nº 7, pii: E382, 2018. doi: 10.3390/v10070382.

BNDES, 2017. **Suinocultura: panorama da atividade no Brasil**. Disponível em: <<https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home/conhecimento/noticias/noticia/suinocultura-infografico>>. Acesso em: 07 de nov de 2017.

BRACHT, A. J. et al. **Real-Time Reverse Transcription PCR Assay for Detection of Senecavirus A in Swine Vesicular Diagnostic Specimens**. *PloS One*, [s.l.], v. 11, nº 1, p. e0146211, 2016. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0146211.

BROOKS, J. P. et al. **The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies.** *BMC microbiology*, [s.l.], v. 15, p. 66, 2015. ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/s12866-015-0351-6.

CALLAHAN, J. D. et al. **Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, [s.l.], v. 220, n° 11, p. 1636–1642, 2002. ISSN: 0003-1488.

CAMACHO, C. et al. **BLAST+: architecture and applications.** *BMC Bioinformatics*, v.10, p. 421, 2009. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.

CANNING, P. et al. **Neonatal Mortality, Vesicular Lesions and Lameness Associated with Senecavirus A in a U.S. Sow Farm.** *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], v. 63, n° 4, p. 373–378, 2016. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12516.

CAO, L. et al. **Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications.** *Biosensors & Bioelectronics*, [s.l.], v. 90, p. 459–474, 2017. ISSN: 1873-4235, DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.082.

CAPORASO, J. G. et al. **Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms.** *The ISME journal*, [s.l.], v. 6, n° 8, p. 1621–1624, 2012. ISSN: 1751-7370, DOI: 10.1038/ismej.2012.8.

CARGNELUTTI, J. F. et al. **Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, [s.l.], v. 26, n° 6, p. 788–794, 2014. ISSN: 1943-4936, DOI: 10.1177/1040638714553428.

CASTRIGNANO, S. B.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K. **The metagenomic approach and causality in virology.** *Revista de Saúde Pública*, [s.l.], v. 49, 2015. ISSN: 0034-8910, DOI: 10.1590/S0034-8910.2015049005475.

CATTOLI, G.; CAPUA, I. **Molecular diagnosis of avian influenza during an outbreak.** *Developments in Biologicals*, [s.l.], v. 124, p. 99–105, 2006. ISSN: 1424-6074.

CZECZKO, P. et al. **EzMap: a simple pipeline for reproducible analysis of the human virome.** *Bioinformatics*, v. 33, n° 16, p. 2573-2574, 2017. doi: 10.1093/bioinformatics/btx202.

CHEN, Q. et al. **Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States.** *Virol J.*, v. 15, n° 1, p.: 95, 2018. doi: 10.1186/s12985-018-1001-z

CHEVAL, J. et al. **Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples.** *Journal of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 49, n° 9, p. 3268–3275, 2011. ISSN: 1098-660X, DOI: 10.1128/JCM.00850-11.

CORTELLI, S. C. et al. **Epidemiologia molecular: uma abordagem crítica em relação à pesquisa em periodontologia.** *Periodontia*, [s.l.], p. 7–14, 2007.

DALL AGNOL, A. M. et al. **A TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets.** *Molecular and Cellular Probes*, [s.l.], v. 33, p. 28–31, 2017. ISSN: 1096-1194, DOI: 10.1016/j.mcp.2017.03.002.

DENNER, J. **The porcine virome and xenotransplantation.** *Virol J.*, v. 14, n° 1, p.171, 2017. doi: 10.1186/s12985-017-0836-z.

DE OLIVEIRA, AM et al. **Development and validation of rt-qpcr for vesicular stomatitis virus detection (Alagoas vesiculovirus).** *J Virol Methods*, v.257, p. 7-11, 2018 DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.03.011.

DEVONSHIRE, A. S. et al. **The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis.** *BMC Infectious Diseases*, [s.l.], v. 16, 2016. ISSN: 1471-2334, DOI: 10.1186/s12879-016-1696-7.

DONG, G. et al. **Development and evaluation of a droplet digital PCR assay for the detection of fowl adenovirus serotypes 4 and 10 in attenuated vaccines.** *J Virol Methods*. pii:S0166-0934(18)30417-8, 2018. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.005.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** *BMC evolutionary biology*, [s.l.], v. 7, p. 214, 2007. ISSN: 1471-2148, DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.

DUNAY, G. A. et al. **Assessment of the HIV-1 reservoir in CD4+ regulatory T cells by a Droplet Digital PCR based approach.** *Virus Research*, [s.l.], v. 240, p. 107–111, 2017. ISSN: 1872-7492, DOI: 10.1016/j.virusres.2017.07.008.

EMBRAPA, 2017. **Estatística-Mundo-Suínos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo>>. Acesso em: 22 de jan de 2019.

FAO, 2019. **Food and Agriculture Organization of the United Nation for a world without hunger.** Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and Health. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html>. Acesso em: 22 de jan de 2019.

FERONATO, C. et al. **Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis.** *Tropical Animal Health and Production*, [s.l.], 2017. ISSN: 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-017-1436-z.

FERNANDES, M.H.V. et al. **Pathogenicity and cross-reactive immune responses of a historical and a contemporary Senecavirus A strains in pigs.** *Virology*, v. 522, p. 147-157, 2018. Doi: 10.1016/J.Virol.2018.06.003.

FISHER, G. **Biosseguridade na produção de suínos.** In: Fabiane Pereira Gentilini Marcos Antonio Anciuti. Tópicos atuais na produção de suínos e aves. 2013, p. 256-271.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 888 p.

FOWLER, V. L. et al. **Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus-1 associated with emerging cases of vesicular disease in pigs**. *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 239, p. 34–37, 2017. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.10.012.

GAUTIER, C. et al. **Gene expression profiling during hibernation in the European hamster**. *Sci Rep*. v.8, n.1, p.13167, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-31506-2.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building**. *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 27, n° 2, p. 221–224, 2010. ISSN: 1537-1719, DOI: 10.1093/molbev/msp259.

GREEN, B. D.; KELLER, M. **Capturing the uncultivated majority**. *Current Opinion in Biotechnology*, [s.l.], v. 17, n° 3, p. 236–240, 2006. ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/j.copbio.2006.05.004.

GUIMARÃES et al. 2017. **Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/11794/1/BS%2045%20Suinocultura%20-%20estrutura%20da%20cadeia%20produtiva%2C%20panorama%20do%20setor%20no%20Brasil%5B...%5D_P.pdf>. Acesso em: 07de nov de 2017.

GUO, B. et al. **Novel Senecavirus A in Swine with Vesicular Disease, United States, July 2015**. *Emerging Infectious Diseases*, [s.l.], v. 22, n° 7, p. 1325–1327, 2016. ISSN: 1080-6059, DOI: 10.3201/eid2207.151758.

GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I. et al. **Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens**. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, [s.l.], v. 1302, p. 331–347, 2015. ISSN: 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-4939-2620-6_24.

HALES, L. M. et al. **Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus**. *The Journal of General Virology*, [s.l.], v. 89, n° Pt 5, p. 1265–1275, 2008. ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.83570-0.

HALL, R. J. et al. **Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery**. *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 195, p. 194–204, 2014. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.08.035.

HAYDEN, R. T. et al. **Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus**. *Journal of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 51, n° 2, p. 540–546, 2013. ISSN: 1098-660X, DOI: 10.1128/JCM.02620-12.

HENRICH, T. J. et al. **Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 186, n° 1–2, p. 68–72, 2012. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.019.

HEREDIA, N.J. **Droplet Digital™ PCR Next-Generation Sequencing Library QC Assay.** *Methods Mol Biol.* v.1768, p. 477-488, 2018;. doi: 10.1007/978-1-4939-7778-9_27.

HESSE, U. et al. **Virome Assembly and Annotation: A Surprise in the Namib Desert.** *Front Microbiol.* v.8, p. 13, 2017 doi: 10.3389/fmicb.2017.00013.

HINDSON, B. J. et al. **High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number.** *Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 83, n° 22, p. 8604–8610, 2011. ISSN: 1520-6882, DOI: 10.1021/ac202028g.

HOUSE, J.A., HOUSE, C.A. **Vesicular Diseases.** In Disease of Swine (8th Edition). Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor. Cap25, p.1256. Ames, IW: Iowa State University Press, 1999. 8th Edition. Hardcover.United States.1999

IBGE, 2017. **Produção da Pecuária Municipal.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf>. Acesso em: 19 de fev de 2019.

IBGE, 2018. **Indicadores IBGE Estatística da Produção Pecuária Abr-Jun de 2018.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_2tri.pdf>. Acesso em: 17 de set de 2018.

ICTV, 2019. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** Disponível em: <[http:// https://talk.ictvonline.org/taxonomy/](http://https://talk.ictvonline.org/taxonomy/)>. Acesso em: 24 de jan de 2019.

JIA, P. et al. **Analytical validation of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for quantitative detection of infectious hematopoietic necrosis virus.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 245, p. 73–80, 2017. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.03.010.

JONES, M. et al. **Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, ‘definetherain’.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 202, n° 100, p. 46–53, 2014. ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.02.020.

JOSEFSEN, M. H. et al. **Microbial food safety: Potential of DNA extraction methods for use in diagnostic metagenomics.** *Journal of Microbiological Methods*, [s.l.], v. 114, p. 30–34, 2015. ISSN: 1872-8359, DOI: 10.1016/j.mimet.2015.04.016.

JOSHI, L. R. et al (a). **Detection of the Emerging Picornavirus Senecavirus A in Pigs, Mice, and Houseflies.** *Journal of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 54, n° 6, p. 1536–1545, 2016. ISSN: 1098-660X, DOI: 10.1128/JCM.03390-15.

JOSHI, L. R. et al. (b). **Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs.** *The Journal of General Virology*, [s.l.], v. 97, n° 12, p. 3267–3279, 2016. ISSN: 1465-2099, DOI: 10.1099/jgv.0.000631.

KANITZ, F. A. et al. **Molecular epidemiology of an outbreak of bovine rabies in central Rio Grande do Sul, Brazil, 2012.** *Ciência Rural*, [s.l.], v. 44, n° 5, p. 834–840, 2014. ISSN: 0103-8478, DOI: 10.1590/S0103-84782014000500012.

KARLSSON, O. E. et al. **Metagenomic detection methods in biopreparedness outbreak scenarios.** *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*, [s.l.], v. 11 Suppl 1, p. S146-157, 2013. ISSN: 1557-850X, DOI: 10.1089/bsp.2012.0077.

KNIGHT-JONES, T. J. D.; RUSHTON, J. **The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur?** *Preventive Veterinary Medicine*, [s.l.], v. 112, n° 3–4, p. 161–173, 2013. ISSN: 1873-1716, DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.013.

KNOWLES, N. J. **The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue.** *The Veterinary Record*, [s.l.], v. 122, n° 18, p. 441–442, 1988. ISSN: 0042-4900.

KNOWLES, N.J. et al. **Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States.** Northern Lights EUROPIIC 2006: XIVth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Saariselkä, Inari, Finland, 26th November-1st December, 2006. Abstract G2.

KOHL, C. et al. **Protocol for Metagenomic Virus Detection in Clinical Specimens.** *Emerging Infectious Diseases*, [s.l.], v. 21, n° 1, p. 48, 2015. DOI: 10.3201/eid2101.140766.

KUMAR, S. et al. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.** *Mol Biol Evol.*, v.7, p.1870-4. 2016 doi:10.1093/molbev/msw054.

KUNDEL, H. L.; POLANSKY, M. **Measurement of observer agreement.** *Radiology*, [s.l.], v. 228, n° 2, p. 303–308, 2003. ISSN: 0033-8419, DOI: 10.1148/radiol.2282011860.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M. et al. **Molecular epidemiology of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil.** *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, [s.l.], v. 216, p. 207–209, 2016. ISSN: 1532-2971, DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.08.013.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M. et al. **Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection.** *Arch Virol*, v.162, n° 9, p.2797-2801, 2017. doi: 10.1007/s00705-017-3407-0.

LAURIE, M. T. et al. **Simultaneous digital quantification and fluorescence-based size characterization of massively parallel sequencing libraries.** *BioTechniques*, [s.l.], v. 55, n° 2, p. 61–67, 2013. ISSN: 1940-9818, DOI: 10.2144/000114063.

LEME, R. A. et al. **Senecavirus A: An Emerging Vesicular Infection in Brazilian Pig Herds.** *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], v. 62, n° 6, p. 603–611, 2015. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12430.

LEME, Raquel A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. **Update on Senecavirus Infection in Pigs.** *Viruses*, [s.l.], v. 9, n° 7, 2017a. ISSN: 1999-4915, DOI: 10.3390/v9070170.

LI, H. et al. **Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases.** *Biosci Rep.* pii: BSR20181170, 2018. doi: 10.1042/BSR20181170.

LIU, J. et al. **The diversity and host interactions of Propionibacterium acnes bacteriophages on human skin.** *ISME J*, v. 9, n° 9, p. 2078-93, 2015. doi: 10.1038/ismej.2015.47.

LI, L.; DELWART, E. **From orphan virus to pathogen: the path to the clinical lab.** *Current Opinion in Virology*, [s.l.], v. 1, n° 4, p. 282–288, 2011. ISSN: 1879-6265, DOI: 10.1016/j.coviro.2011.07.006.

LILLSUNDE LARSSON, G.; HELENIUS, G. **Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report.** *Cellular Oncology (Dordrecht)*, [s.l.], 2017. ISSN: 2211-3436, DOI: 10.1007/s13402-017-0331-y.

LINDGREEN, S. et al. **An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools.** *Sci Rep.* v.6, p.19233, 2016. doi: 10.1038/srep19233.

LIU, L. et al. **Comparison of next-generation sequencing systems.** *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, [s.l.], v. 2012, p. 251364, 2012. ISSN: 1110-7251, DOI: 10.1155/2012/251364.

LUBROTH, J., RODRÍGUEZ, L., DEKKER, A. **Vesicular Diseases.** In Diseases of Swine. Barbara E. Straw, Jeffrey J. Zimmerman, Sylvie D'allaire, David J. Taylor. 2013. Cap 31, p.517-535.

LUI, Y. L. E.; TAN, E. L. **Droplet digital PCR as a useful tool for the quantitative detection of Enterovirus 71.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 207, p. 200–203, 2014. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.07.014.

MAGGIOLI, M.F. et al. **Adaptive Immune Responses following Senecavirus A Infection in Pigs.** *J Virol*, v. 92, n° 3, pii: e01717-17. 2018 doi: 10.1128/JVI.01717-17.

MALIRAT, V. et al. **Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America.** *Virus Research*, [s.l.], v. 124, n° 1–2, p. 22–28, 2007. ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/j.virusres.2006.09.006.

MARDIS, E. R. **Next-generation DNA sequencing methods.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, [s.l.], v. 9, p. 387–402, 2008. ISSN: 1527-8204, DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

METZKER, M. L. **Sequencing technologies - the next generation.** *Nature Reviews. Genetics*, [s.l.], v. 11, n° 1, p. 31–46, 2010. ISSN: 1471-0064, DOI: 10.1038/nrg2626.

- MEYER, F. et al. **The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes.** *BMC bioinformatics*, [s.l.], v. 9, p. 386, 2008. ISSN: 1471-2105, DOI: 10.1186/1471-2105-9-386.
- MIOTKE, L. et al. **High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR.** *Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 86, n° 5, p. 2618–2624, 2014. ISSN: 1520-6882, DOI: 10.1021/ac403843j.
- MOHAMED, F. et al. **Foot-and-mouth disease in feral swine: susceptibility and transmission.** *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], v. 58, n° 4, p. 358–371, 2011. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01213.x.
- MONTIEL, N. et al. **Vesicular Disease in 9-Week-Old Pigs Experimentally Infected with Senecavirus A.** *Emerging Infectious Diseases*, [s.l.], v. 22, n° 7, p. 1246–1248, 2016. ISSN: 1080-6059, DOI: 10.3201/eid2207.151863.
- MORGAN, J. L.; DARLING, A. E.; EISEN, J. A. **Metagenomic sequencing of an in vitro-simulated microbial community.** *PloS One*, [s.l.], v. 5, n° 4, p. e10209, 2010. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0010209.
- MORIONES, E. et al. **Tomato Leaf Curl New Delhi Virus: An Emerging Virus Complex Threatening Vegetable and Fiber Crops.** *Viruses*. v.9, n° 10, pii: E264, 2017. doi: 10.3390/v9100264.
- MORSINK, M. C. et al. **Molecular diagnostic analysis of outbreak scenarios.** *Biochemistry and Molecular Biology Education*, [s.l.], v. 40, n° 2, p. 112–120, 2012. ISSN: 1539-3429, DOI: 10.1002/bmb.20562.
- MUNDAY, B. L.; RYAN, F. B. **Vesicular lesions in swine - possible association with the feeding of marine products.** *Australian Veterinary Journal*, [s.l.], v. 59, n° 6, p. 193, 1982. ISSN: 0005-0423.
- INOUE-NAGATA, A.K. et al. **A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management.** *Hortic. Bras*, v.34, n° 1, p. 8-18, 2016. dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002
- NELSON, K. E. **Microbiomes.** *Microbial Ecology*, [s.l.], v. 65, n° 4, p. 916–919, 2013. ISSN: 0095-3628, 1432-184X, DOI: 10.1007/s00248-013-0227-y.
- NICOT, F. et al. **Quantification of HEV RNA by Droplet Digital PCR.** *Viruses*, [s.l.], v. 8, n° 8, 2016. ISSN: 1999-4915, DOI: 10.3390/v8080233.
- NORLING, M. et al. **MetLab: An In Silico Experimental Design, Simulation and Analysis Tool for Viral Metagenomics Studies.** *PloS One*, [s.l.], v. 11, n° 8, p. e0160334, 2016. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0160334.
- OIE, 2012. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** Chapter 2.1.5.

OIE, 2017. **Animal health situation**. The World Organisation For Animal Health (OIE). Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation>. Acesso em: 14 de out de 2018.

OIE. 2017. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). Chapter 2.1.8. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_FMD.pdf>. Acesso em: 14 de out de 2018.

OOMI, H. et al. **Propionibacterium from Liver and Lung of Pigs and Guinea Pigs. 1: Physiological Identification**. *Anaerobe*, v. 8, n° 4, p. 223-231, 2002. DOI: 10.1006/anae.2002.0413

PAIXÃO, T. A. et al. **Diagnosis of foot-and mouth disease by real time reverse transcription polymerase chain reaction under field conditions in Brazil**. *BMC Veterinary Research*, [s.l.], v. 4, p. 53, 2008. ISSN: 1746-6148, DOI: 10.1186/1746-6148-4-53.

PASMA, T.; DAVIDSON, S.; SHAW, S. L. **Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba**. *The Canadian Veterinary Journal*, [s.l.], v. 49, n° 1, p. 84–85, 2008a. ISSN: 0008-5286.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, T. F. et al. **Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin**. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, [s.l.], v. 41, n° 6, p. 407–414, 2013. ISSN: 1095-8320, DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.08.005.

PINHEIRO-DE-OLIVEIRA, T.F. et al. **Development of a droplet digital RT-PCR for the quantification of foot-and-mouth virus RNA**. *J Virol Methods*. v. 259, p. 129-134, 2018. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.06.015.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, T. F. et al. **Porcine parvovirus as a contaminant in cell cultures and laboratory supplies**. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, [s.l.], v. 44, n° 2, p. 53–59, 2016. ISSN: 1095-8320, DOI: 10.1016/j.biologicals.2015.12.003.

PINHEIRO-DE-OLIVEIRA, T.F. et al. **Reverse Transcriptase Droplet Digital PCR to identify the emerging vesicular virus Senecavirus A in biological samples, 2019** *Transbound Emerg Dis.*, 2019 Mar 12. DOI: 10.1111/tbed.13168

POHL, G.; SHIH, I.-M. **Principle and applications of digital PCR**. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 41–47, 2004. ISSN: 1473-7159.

POSADA, D. **jModelTest: phylogenetic model averaging**. *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 25, n° 7, p. 1253–1256, 2008. ISSN: 1537-1719, DOI: 10.1093/molbev/msn083.

QIAN, S. et al. **Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016.** *Virology Journal*, [s.l.], v. 13, 2016. ISSN: 1743-422X, DOI: 10.1186/s12985-016-0631-2.

QUAIL, M. A. et al. **A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers.** *BMC genomics*, [s.l.], v. 13, p. 341, 2012. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-13-341.

QUAN, P.L. et al. **dPCR: A Technology Review.** *Sensors (Basel)*. v.18, n° 4, pii: E1271, 2018. doi: 10.3390/s18041271.

RACANIELLO, V.R; **Picornaviridae: The viroses and their Replication.** In: KNIPE, D.M, HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer, 2013.p.453-711.

RAMPELLI, S.; TURRONI, S. **From Whole-Genome Shotgun Sequencing to Viral Community Profiling: The ViromeScan Tool.** *Methods Mol Biol*. v. 1746, p. 181-185, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7683-6_14.

RAINWATER-LOVETT, K. et al. **Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004-2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains.** *The Journal of General Virology*, [s.l.], v. 88, n° Pt 7, p. 2042–2051, 2007. ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.82644-0.

REED, L.J, MUENCH, H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** *Am J Hyg*. 1938. Cap.27, p.493–497.

REDDY, P. S. et al. **Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers.** *Journal of the National Cancer Institute*, [s.l.], v. 99, n° 21, p. 1623–1633, 2007. ISSN: 1460-2105, DOI: 10.1093/jnci/djm198.

REN, M. et al. **Detection of pseudorabies virus by duplex droplet digital PCR assay.** *J Vet Diagn Invest*. v. 30, p.105-112, 2018. doi: 10.1177/1040638717743281.

RESENDE, T. P.; MARTHALER, D. G.; VANNUCCI, F. A. **A novel RNA-based in situ hybridization to detect Seneca Valley virus in neonatal piglets and sows affected with vesicular disease.** *PloS One*, [s.l.], v. 12, n° 4, p. e0173190, 2017. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0173190.

REVELL, L.J. et al. **Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate.** *Syst Biol*, v. 57, n° 4, p. 591-601, 2008 doi: 10.1080/10635150802302427.

RHO, M. et al. **FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads.** *Nucleic Acids Res*. v. 38, n° 20, p.e191, 2010. doi: 10.1093/nar/gkq747.

RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R. **Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR.** *Mol Cell Probes*, v.12, n° 2, p. 101-6. 1998

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. **Metagenomics: genomic analysis of microbial communities**. *Annual Review of Genetics*, [s.l.], v. 38, p. 525–552, 2004. ISSN: 0066-4197, DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216.

RODRIGUEZ, L.L. et al. **Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction**. *J Clin Microbiol*, v.31, nº 8, p.2016-20. 1993.

ROSEN, R. et al. **Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors**. *Curr Opin Virol*, v.15, p.1-8, 2015. doi: 10.1016/j.coviro.2015.06.008.

ROUX, S. et al. **Metavir: a web server dedicated to virome analysis**. *Bioinformatics (Oxford, England)*, [s.l.], v. 27, nº 21, p. 3074–3075, 2011. ISSN: 1367-4811, DOI: 10.1093/bioinformatics/btr519.

ROUX, S. et al. **Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis**. *BMC bioinformatics*, [s.l.], v. 15, p. 76, 2014. ISSN: 1471-2105, DOI: 10.1186/1471-2105-15-76.

ROUX, S. et al. **Benchmarking viromics: an in silico evaluation of metagenome-enabled estimates of viral community composition and diversity**. *PeerJ*, [s.l.], v. 5, p. e3817, 2017. ISSN: 2167-8359, DOI: 10.7717/peerj.3817.

RUDIN, C. M. et al. **Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replication-competent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features**. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, [s.l.], v. 17, nº 4, p. 888–895, 2011. ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1706.

SAENG-CHUTO, K. et al. **The first detection of Senecavirus A in pigs in Thailand, 2016**. *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], 2017. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12654.

SANTOS FILHO, J.I. et al. **Os 35 anos que mudaram a avicultura brasileira**. In: Sonho, Desafio e Tecnologia, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia: EMBRAPA-CNPQA, 2011. 470 p. Disponível em: <[http://www.avisite.com.br/economia/estatistica.asp?acao=alojamentoregional\(2011\)](http://www.avisite.com.br/economia/estatistica.asp?acao=alojamentoregional(2011))>. Acesso em: 15 de set de 2015.

SCHLOSS, P. D. et al. **Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities**. *Applied and Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 75, nº 23, p. 7537–7541, 2009. ISSN: 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.01541-09.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. **Biotechnological prospects from metagenomics**. *Current Opinion in Biotechnology*, [s.l.], v. 14, nº 3, p. 303–310, 2003. ISSN: 0958-1669.

SCHMIDT, H.A. et al. **TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing**. *Bioinformatics*. v.18, nº3, p. 502-4, 2002.

SCHRADER, C. et al. **PCR inhibitors - occurrence, properties and removal.** *J Appl Microbiol.* [s.l.], v.113, n° 05, p. 1014-26, 2012. ISSN: 1365-2672, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

SEDLAK, R. H. et al. **Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus.** *Journal of Clinical Microbiology*, [s.l.], v. 52, n° 8, p. 2844–2848, 2014. ISSN: 1098-660X, DOI: 10.1128/JCM.00803-14.

SEGALÉS, J. et al. **Senecavirus A.** *Veterinary Pathology*, [s.l.], v. 54, n° 1, p. 11–21, 2017. ISSN: 1544-2217, DOI: 10.1177/0300985816653990.

SHARMA, G.K. et al. , Developed for the control of foot-and-mouth disease in India. *WORLD J VIROL*, v.4, n.3, p.295-302, 2015. DOI: 10.5501/WJV.V4.I3.295.

SHAN, T. et al. **The fecal virome of pigs on a high-density farm.** *J Virol.* 2011, v. 85, n° 22, p.11697-708. doi: 10.1128/JVI.05217-11.

SINGH, K. et al. **Seneca Valley Virus and Vesicular Lesions in a Pig with Idiopathic Vesicular Disease.** *Journal of Veterinary Science & Technology*, [s.l.], v. 3, n° 6, p. 1–3, 2012. ISSN: 2157-7579, DOI: 10.4172/2157-7579.1000123.

SKARADZIŃSKA, A. et al. **The Efficacy of Isolated Bacteriophages from Pig Farms against ESBL/AmpC-Producing Escherichia coli from Pig and Turkey Farms.** *Front Microbiol*, v.8, p.530, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00530.

SMITH, A. W.; AKERS, T. G. **Vesicular exanthema of swine.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, [s.l.], v. 169, n° 7, p. 700–703, 1976. ISSN: 0003-1488.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema de Produção de Suínos: programa de biossegurança.** 2002. p.108.

STERN, A. et al. **Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 35, n° Web Server issue, p. W506–W511, 2007. ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkm382.

SUN, D. et al. **Emergence and whole-genome sequence of Senecavirus A in Colombia.** *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], v. 64, n° 5, p. 1346–1349, 2017. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12669.

SVRAKA, S. et al. **Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting.** *The Journal of General Virology*, [s.l.], v. 91, n° Pt 11, p. 2846–2856, 2010. ISSN: 1465-2099, DOI: 10.1099/vir.0.024612-0.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 30, n° 12, p. 2725–2729, 2013. ISSN: 1537-1719, DOI: 10.1093/molbev/mst197.

TANG, P.; CHIU, C. **Metagenomics for the discovery of novel human viruses.** *Future Microbiology*, [s.l.], v. 5, n° 2, p. 177–189, 2010. ISSN: 1746-0921, DOI: 10.2217/fmb.09.120.

TAYLOR, S. C. et al. **Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 224, p. 58–66, 2015a. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.08.014.

TOUSIGNANT, S. J. P. et al. **Longitudinal study of Senecavirus a shedding in sows and piglets on a single United States farm during an outbreak of vesicular disease.** *BMC Veterinary Research*, [s.l.], v. 13, 2017. ISSN: 1746-6148, DOI: 10.1186/s12917-017-1172-7.

THEUNS, S. et al. **Characterization of a genetically heterogeneous porcine rotavirus C, and other viruses present in the fecal virome of a non-diarrheic Belgian piglet.** *Infect Genet Evol.* v.43, p.135-45, 2016. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.018.

THULIN, H. et al. **Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2.** *J Virol Methods.* v.260, p.70-74, 2018. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.07.003

UNTERGASSER, A. et al. **Primer3—new capabilities and interfaces.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 40, n° 15, p. e115, 2012. ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gks596.

USDA, 2018. **Pork Production - Selected Countries Summary.** United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 14 de set de 2018.

VANNUCCI, F. A. 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*, [s.l.], v. 62, n° 6, p. 589–593, 2015a. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12410.

VENKATARAMAN, S. et al. **Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus.** *Structure (London, England: 1993)*, [s.l.], v. 16, n° 10, p. 1555–1561, 2008. ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/j.str.2008.07.013.

VERHAEGEN, B. et al. **Comparison of Droplet Digital PCR and qPCR for the Quantification of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Bovine Feces.** *Toxins*, [s.l.], v. 8, n° 5, 2016. ISSN: 2072-6651, DOI: 10.3390/toxins8050157.

VYNCK et al. **On determining the power of digital PCR experiments.** *Anal Bioanal Chem.* v. 410, n.23, p.5731-5739, 2018. doi:10.1007/s00216-018-1212-6.

VOSSSEN, R. H. A. M.; WHITE, S. J. **Quantitative DNA Analysis Using Droplet Digital PCR.** *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, [s.l.], v. 1492, p. 167–177, 2017. ISSN: 1940-6029, DOI: 10.1007/978-1-4939-6442-0_11.

Xia X. **DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution.** *Mol Biol Evol.* v. 35, n.6, p.1550-1552, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy073.

WADHWA, L. et al. **Treatment of invasive retinoblastoma in a murine model using an oncolytic picornavirus.** *Cancer Research*, [s.l.], v. 67, n° 22, p. 10653–10656, 2007. ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2352.

WANG, L. et al. **Detection and Genomic Characterization of Senecavirus A, Ohio, USA, 2015.** *Emerging Infectious Diseases*, [s.l.], v. 22, n° 7, p. 1321–1323, 2016a. ISSN: 1080-6040, DOI: 10.3201/eid2207.151897.

WANG, J. et al. **Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen.** *J Virol Methods.* v.144, n° 1-2, p.103-8. 2007

WANG, Z. et al. **Emergence of a novel recombinant Seneca Valley virus in Central China, 2018.** *Emerg Microbes Infect.* v.7, n° 1, p.180. 2018 doi: 10.1038/s41426-018-0183-1.

WEAVER, G. V. et al. **Foot and mouth disease: a look from the wild side.** *Journal of Wildlife Diseases*, [s.l.], v. 49, n° 4, p. 759–785, 2013. ISSN: 1943-3700, DOI: 10.7589/2012-11-276.

WILLCOCKS, M. M. et al. **Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES.** *Journal of Virology*, [s.l.], v. 85, n° 9, p. 4452–4461, 2011. ISSN: 1098-5514, DOI: 10.1128/JVI.01107-10.

WOMMACK, K. E. et al. **VIROME: a standard operating procedure for analysis of viral metagenome sequences.** *Standards in Genomic Sciences*, [s.l.], v. 6, n° 3, p. 427–439, 2012. ISSN: 1944-3277, DOI: 10.4056/sigs.2945050.

WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. **A primer on metagenomics.** *PLoS computational biology*, [s.l.], v. 6, n° 2, p. e1000667, 2010. ISSN: 1553-7358, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000667.

WOOLHOUSE, M.E. et al. **Temporal trends in the discovery of human viruses.** *Proc Biol Sci.* [s.l.], v. 275, n° 1647, p.2111-5. doi: 10.1098/rspb.2008.0294. 2008

WU, Q. et al. **The First Identification and Complete Genome of Senecavirus A Affecting Pig with Idiopathic Vesicular Disease in China.** *Transboundary and Emerging Diseases*, [s.l.], v. 64, n° 5, p. 1633–1640, 2017. ISSN: 1865-1682, DOI: 10.1111/tbed.12557.

WU, X. et al. **Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus.** *Journal of Virological Methods*, [s.l.], v. 248, p. 166–171, 2017. ISSN: 1879-0984, DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.06.015.

Wu, X. et al. **Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction**

(ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus. *Can J Vet Res.* v. 82, p. 70-74, 2018.

WYLIE, K. M.; WEINSTOCK, G. M.; STORCH, G. A. **Emerging view of the human virome.** *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, [s.l.], v. 160, n° 4, p. 283–290, 2012. ISSN: 1878-1810, DOI: 10.1016/j.trsl.2012.03.006.

YANG, M.; BRUGGEN, R. VAN; XU, W. **Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, [s.l.], v. 24, n° 1, p. 42–50, 2012a. ISSN: 1943-4936, DOI: 10.1177/1040638711426323.

YANG, Q. et al. **The development of a sensitive droplet digital PCR for quantitative detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [s.l.], v. 104, n° Pt A, p. 1223–1228, 2017. ISSN: 1879-0003, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.115.

YE, J. et al. **Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.** *BMC bioinformatics*, [s.l.], v. 13, p. 134, 2012. ISSN: 1471-2105, DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

ZEC et al. **Novel droplet platforms for the detection of disease biomarkers.** *Expert Rev Mol Diagn.* v.14, n.7, p. 787-801, 2014. doi:10.1586/14737159.2014.945437.

ZHANG, J. et al. **Full-Length Genome Sequences of Senecavirus A from Recent Idiopathic Vesicular Disease Outbreaks in U.S. Swine.** *Genome Announcements*, [s.l.], v. 3, n° 6, 2015. ISSN: 2169-8287, DOI: 10.1128/genomeA.01270-15.

ZHAO, G. et al. **VirusSeeker, a computational pipeline for virus discovery and virome composition analysis.** *Virology*, [s.l.], v. 503, p. 21–30, 2017. ISSN: 1096-0341, DOI: 10.1016/j.virol.2017.01.005.

ZHAO, G. et al. **Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer.** *BMC Cancer*, v.18, n.1, p. 676, 2018. doi: 10.1186/s12885-018-4601-5.