

**MARTA MARIA NERY FARIAS DA SILVA**

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS  
DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (2001-2009): NOVO SUBGENÓTIPO - 1.5**

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MARTA MARIA NERY FARIAS DA SILVA**

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS  
DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (2001-2009): NOVO SUBGENÓTIPO - 1.5**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS  
DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (2001-2009): NOVO SUBGENÓTIPO - 1.5**

Tese de Doutorado elaborada por

MARTA MARIA NERY FARIAS DA SILVA

Aprovada em ..23...../....Fevereiro...../.2016.....

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. ROBERTO SOARES DE CASTRO

Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof<sup>a</sup>. Dra. ANA CLAUDIA CAMPOS – UFS (TITULAR)

Prof. Dr. JOSÉ WILTON PINHEIRO JUNIOR – UFRPE (TITULAR)

Prof<sup>a</sup>. Dra. ANDRÉA ALICE DA FONSECA OLIVEIRA - UFRPE (TITULAR)

Prof<sup>a</sup> Dra. TOMOE NODA SAUKAS – UFRPE (TITULAR)

## AGRADECIMENTOS

Deus por tanto que tem feito por mim e por minha família, sem sua benção não estaria aqui.

À Dra. Diana Sione Pinheiro (Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE)).

Ao Professor Roberto Soares de Castro, pelo estímulo para conduzir essa pesquisa, competente orientação e pela amizade.

Dra. Adriana Soares Leite pelo apoio recebido.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Tomoe Noda Saukas, pelo incentivo, apoio e amizade.

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior, pelo apoio.

Aos amigos de trabalho do Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE).

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À minha família, em especial meus filhos Diogo e Danilo, para quem dedico o meu trabalho.

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo realizar a análise filogenética de amostras virais isoladas em surtos de Peste Suína Clássica no Brasil. Foram utilizadas 11 amostras virais isoladas nos surtos de PSC no período de 2001 á 2009, procedentes dos estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Maranhão (MA) e Amapá (AP). Para a análise filogenética as amostras foram submetidas à extração do RNA seguida da reação de transcrição reversa-PCR (RT-PCR) direcionadas para amplificar a sequência completa (1.119 nucleotídeos) do gene E2 viral. Para o estudo filogenético todas as amostras foram sequenciadas e as árvores filogenéticas foram realizadas pelo método de *Neighbor Joining* com 1.000 réplicas *debootstrap*. Os isolados A06 e A19 (ambos do estado do Maranhão) agruparam com alto índice de confiança com as cepas pertencentes ao subgenótipo 1.1. Já os demais isolados (A02, A09, A15, A16, A20, A27, Ceará; A05, Rio Grande do Norte; e A11 e A12, Amapá), mostraram-se menos relacionados ao subgenótipo 1.1., formando um novo subgenótipo, designado 1.5. Ressalta-se que estudos epidemiológicos e moleculares devem ser realizados de forma contínua para que se entenda a dinâmica dos surtos de PSC e conseqüentemente as perdas ocasionadas por esta enfermidade sejam reduzidas.

Palavras-Chave: árvore filogenética; epidemiologia molecular; suídeos;

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to conduct a phylogenetic analysis of viral samples isolated on Classical Swine Fever outbreaks in Brazil. Eleven viral isolates in CSF outbreaks in the period 2001 to 2009 were used in this study. The samples were submitted to RNA extraction and the full-length E2 gene of CSF virus (1.119 nucleotides) was amplified by PCR and sequenced. The sequences were analyzed by the programs contained in STADEN package and the phylogenetic analyses were performed by Neighbor Joining method with 1000 bootstrap replicates using the MEGA 6.6 program. The A06 and A19 isolates (both from the state of Maranhão) grouped with high level of confidence with strains belonging to subgenotype 1.1. The other Brazilian isolates (A02, A09, A15, A16, A20, A27, from Ceará; A05, from Rio Grande do Norte; e A11 e A12, from Amapá) presented a different segregation pattern into the subgenotype 1.1, forming a separate group within genotype 1, subgenotype 1.5. It is emphasized that epidemiological and molecular studies should be conducted continuously in order to understand the dynamics of outbreaks and thus reduce the losses caused by this disease.

Keyword: Classical swine fever, virus, swine, phylogenetic study

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	10
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	11
<b>3.1 ETIOLOGIA</b>	11
<b>3.2 Epidemiologia</b>	14
<b>3.3 Patogenia</b>	17
<b>3.4 Sinais clínicos</b>	18
<b>3.5 Diagnóstico</b>	21
<b>3.6 Controle e Prevenção</b>	22
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	25
<b>5. ARTIGO</b>	25
	34

# 1 INTRODUÇÃO

A Peste Suína Clássica (PSC), enfermidade de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal, e uma das mais importantes que acomete suínos domésticos e javalis selvagens (EDWARDS et al., 2000), ocasionando perdas econômicas graves (WESTERGAARD, 1990). Embora erradicada em muitos países, continua a causar sérios problemas em diferentes partes do mundo (MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003).

O vírus da PSC (VPSC) pertence ao gênero Pestivirus da família *Flaviviridae* (KING et al., 2012), possui a característica de ser pequeno, envelopado, RNA de filamento simples com sentido positivo e com o genoma de 12.5 Kb, o qual é delimitado por regiões não traduzidas 5'-terminal e 3'-terminal (5'- NTR, 3'-NTR) (MEYERS; THIEL, 1996). Em comum com todos os flavivírus, o genoma VPSC codifica as proteínas estruturais, incluindo a grande glicoproteína E2 (gp55) na metade 5'do genoma, e proteínas não estruturais, incluindo NS5B, na extremidade 3'. Regiões não codificantes (NCRs) existem em ambas as extremidades 5'e 3' do genoma (MEYERS; THIEL, 1996).

Estudos filogenéticos tem dividido o VPSC em três grupos filogenéticos (1, 2 e 3), com cada grupo sendo dividido em três ou quatro subgenótipos (1.1 a 1.3 ; 2.1 a 2.3; 3.1 a 3.4) (PATON et al., 2000). O subgenótipo 2.1 foi subdividido em 2.1a e 2.1b (DENG et al., 2005, PAN et al., 2005). Björklund et al. (1999), com base na similaridade molecular, dividiram as amostras em dois grupos: um grupo composto por amostras procedentes da Ásia e América do Sul, obtidas antes da década de 80 e isolados antigos da Europa e Estados Unidos da América. No outro grupo com similaridade genética ficaram amostras europeias das décadas de 80 e 90, cinco amostras similares do VPSC procedentes da Alemanha, Holanda e Itália constituíram origem comum dos surtos nesses países.

Estudos de epidemiologia molecular recentes de alguns países endêmicos para PSC sugerem que o vírus em circulação no campo evoluiu sob a seleção positiva exercida pela resposta imune à vacina, conduzindo a novas variantes virais atenuadas que causam forma mais branda da doença (PÉREZ et al., 2012; JI et al., 2014).

A análise genética do fragmento E2 é importante sob o ponto de desenvolvimento de vacinas com marcador VPSC, uma vez que induz imunidade protetora (RUMENAPF et al., 1991; KONIG et al., 1995; VAN RIJN et al., 1996; PEETERS et al., 1997).



No Brasil os últimos surtos de PSC, foram diagnosticados pela técnica de isolamento viral em cultivo de célula, que é um método sensível porém demorado. Entretanto existe a necessidade de se avaliar a variabilidade genética destes vírus que foram isolados. Neste contexto a análise e o monitoramento da evolução do vírus da PSC referente à região E2 que é indicado para análises filogenéticas, para avaliação dos tipos e subtipos virais que circulam no Brasil. Desta forma, objetivou-se com este estudo realizar a análise filogenética das amostras virais isoladas em surtos de Peste Suína Clássica no Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Realizar a análise filogenética de amostras virais isoladas em surtos de peste suína clássica no Brasil

### **2.2. Específico**

Sequenciamento do DNA para análise filogenética e evolutiva das cepas de VPSC de isolados brasileiro.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Etiologia

O vírus da peste suína clássica (VPSC) está classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, os vírus deste gênero são antigenicamente relacionados e possuem estrutura similar (THIEL; PLAGEMANN; MOENNIG, 1996), possui RNA de cadeia simples (WENSVOORT et al., 1989; HORZINEK, 1991).

O VPSC, tem simetria icosaédrica, com 40 a 60nm de diâmetro e com envelope lipídico, pequeno, contendo ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples de sentido positivo, com genoma de aproximadamente 12,3Kb. Possui regiões não codificantes (NCRs) em ambas as extremidades 5'e 3' do genoma. A função das NCRs não é totalmente compreendida, mas eles contêm sequências altamente conservadas e podem ser responsáveis pela tradução e replicação.

O VPSC está envolvido em uma codificação para uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Co-processamento e pós-tradução da poliproteína por proteases celulares e virais produz os produtos de clivagem de 12 N<sup>pro</sup>, C, ERNs, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (COLLETT et al., 1988; WISKERCHEN; BELZER; COLLETT, 1991; TAUTZ et al., 1997; XU et al., 1997; LACKNER et al., 2005; BINTINTAN; MEYERS, 2010).

Os componentes estruturais do vírion incluem a proteína (C) do capsídeo e as glicoproteínas E<sup>ns</sup>, E1, E2 e as proteínas não estruturais NS3 pela NS5B que são essenciais para replicação de RNAdo pestivírus, enquanto N<sup>pro</sup>, p7, NS2 e todas as proteínas estruturais são dispensáveis (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A glicoproteína do envelope E2 é o principal imunógeno, essencial para a replicação (VAN GENNIP et al., 2002) e desempenha um papel importante na adsorção viral para células hospedeiras, juntamente com outras proteínas de superfície, E<sup>ns</sup> e E1 (HULST; MOORMANN, 1997; WANG et al., 2004 ) e forma também homo e heterodímeros com a proteína E1 (WEILAND et al., 1990).

Um epítipo linear importante localizado no chamado "domínio um" é a TAV-epítipo consistindo do TAVSPTTLR aminoácidos (AA) (AA 829 para 837 na VPSC poliproteína), sendo este motivo altamente conservado entre as estirpes de PSC, mas divergente em relação ao Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e estirpes do Vírus da Doença da Fronteira (BDV) (LIN et al., 2000). Vários anticorpos monoclonais são utilizados em diagnóstico e

investigação para PSC, assim como policlonais, que ligam soros hiperimunes para este epítipo (por exemplo WH303 (Veterinária Laboratories Agency, Weybridge Surrey, Reino Unido) e A18 (IDEXX Laboratories, Shiphol-Rijk, Holanda). Além disso, o TAV-epítipo desempenha um papel importante na replicação do VPSC (RISATT et al., 2005).

E2 e E<sup>rns</sup> estão presentes como homodímeros ligados por pontes de dissulfuretonas superfícies dos vírions do VPSC e E2 também está dimerizada com E1 (WEILAND et al., 1990; THIEL et al., 1991; WEILAND et al., 1999). Sendo que E<sup>rns</sup> não possui âncora na membrana celular e é secretada por células infectadas pela indução do gene viral correspondente. Foi verificado que o gene codificador de E<sup>rns</sup> pode sofrer mutações, produzindo apenas efeitos menores na virulência da amostra (MAYER et al., 2003) e uma porção considerável da proteína E<sup>rns</sup> produzida em células infectadas é segregada para o ambiente extracelular e circula nos fluidos corporais de animais infectados (RUMENAPF et al., 1993).

A possível discriminação entre isolados depende do comprimento e variabilidade da região alvo do genoma que é usado para as comparações. Três fragmentos definidos do genoma, 5'NTR, E2 e NS5B foram selecionados por Greiser-Wilke e colaboradores em 2000, em um protocolo padronizado para o cálculo de árvores filogenéticas, sendo estabelecida a nomenclatura dos tipos genéticos. Essas três regiões do genoma do VPSC têm sido sequenciadas e comparadas para avaliar a possibilidade de diferenciação genética entre as amostras isoladas e segregá-las em grupos. Análise de coleções de dados sequenciais compreendendo 150 nucleotídeos da 5'NTR, 190 nucleotídeos do gene da glicoproteína E2 e 409 nucleotídeos do gene polimerase NS5B serviram de base para a formação de três grupos genéticos, com três a quatro subgrupos: 1.1, 1.2, 1.3; 2.1, 2.2, 2.3; 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 (Figura 1). (WANG et al., 2004).

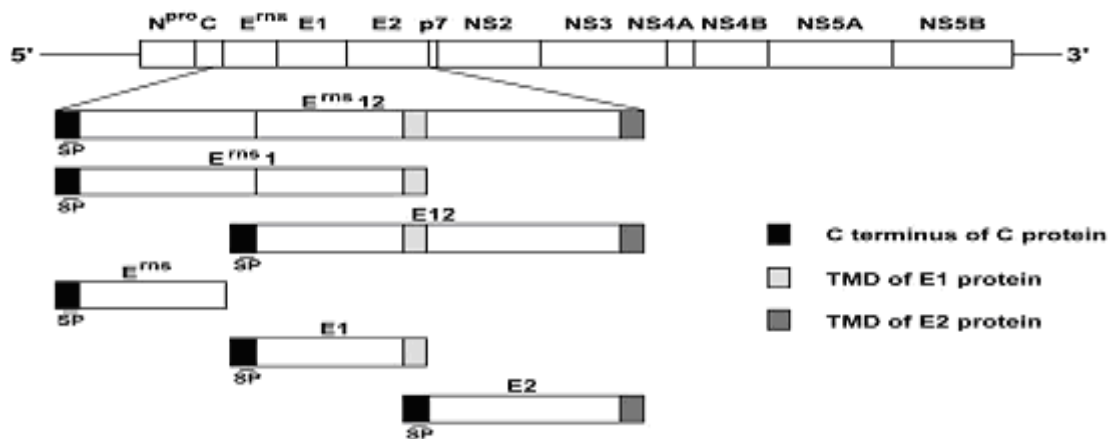


Figura 1 -Construção da expressão de E<sup>ns</sup>, E1 e E2, do vírus da peste suína clássica: SP = sinal peptídico para E<sup>ns</sup>, usado para preparar SP para cada construção; TMD = domínio transmembrana.

Fonte: Wang et al., 2004.

Os membros do grupo 1 são na sua maioria isolados europeus, isolados americanos antigos e recentes, alguns isolados da Ásia e algumas cepas vacinais. A maioria dos isolados de diferentes regiões da Europa e da Ásia foram classificados no grupo 2 e sub-agrupados em 2.1, 2.2 e 2.3. O primeiro relato do vírus do grupo 2 foi na Alemanha, em 1982. Porém posteriormente, esses vírus foram encontrados em diferentes países, incluindo a Itália, França, Bélgica, Reino Unido, Áustria, Suíça, Hungria, República Checa, Polônia e República Eslovaca (HOFMANN; BRECHTBUHL; STAUBER, 1994; BARTAK; GREISER-WILKE, 2000). Os membros do grupo 3 foram isolados principalmente da Coreia, Japão, Taiwan, Tailândia e Reino Unido (PATON et al., 2000; SAKODA et al., 1999).

Estudo realizado, com 115 isolados do VPSC, da região 5'NTR, E2 e NS5B classificou o VPSC em dois grupos, 1 e 2. No grupo 1 a maioria dos isolados foram do Reino Unido e incluem as cepas de referência Alfort/187 da França e da Itália. Enquanto que o Grupo 2 incluiu os vírus isolados a partir dos países asiáticos como Japão e Malásia (LOWINGS et al., 1996). Em outro estudo Stadejek et al. (1997), agruparam os vírus de acordo com suas origens geográficas e identificaram que o vírus é geneticamente heterogêneo na Europa Central. Em Cuba, De Arce et al. (1999) analisaram 15 amostras do VPSC e identificaram um grupo relacionado.

Observa-se na figura 2 a distribuição mundial dos subgenótipos do VPSC (BEER et al., 2015).



Fonte: Beer et al. (2015)

### 3.2. Epidemiologia

A peste suína clássica possui distribuição mundial segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2014). Entre os anos de 1990 a 2000, na Europa, surgiram surtos esporádicos de PSC nas indústrias de suínos (BLOME et al., 2010). Surtos em fazendas foram notificados tais como: 117 na Alemanha, 48 na Bélgica e 429 nos países baixos (MEUWISSEN et al., 1999; SAATKAMP; BERENTSEN; HORST, 2000).

No período de 2005 a 2012 houve notificação confirmada na África do Sul e Madagascar no continente africano; no Camboja; República Popular da China; Taipei; Hong Kong; Índia; Indonésia; República da Coreia; Laos; Malásia; Mianmar; Nepal; Filipinas; Sri Lanka; Tailândia; Vietnã e Butão no continente asiático; em Israel e Armênia no Oriente Médio; na Bósnia e Herzegovina, Bulgária, Croácia, Macedônia, França, Alemanha, Hungria, Lituânia, Montenegro e Sérvia, antes e após a separação destes dois países, na Romênia, Rússia, Sérvia e Eslováquia, no continente europeu e no continente americano houve notificação na Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Cuba, República Dominicana, Equador, El Salvador, Guatemala, Haiti, Honduras, Nicarágua e México (OIE, 2015) e surtos de PSC em pequenas populações de javalis ainda são observados em várias regiões como a Índia (BARMAN et al., 2014).

As notificações brasileiras de PSC à OIE, no período de 2006 a 2009, ocorreram somente, em estados brasileiros pertencentes à zona não livre (Quadro 1) e todas em suínos domésticos.

Quadro 1. Notificações de casos de PSC à OIE feitas pelo Brasil no período de 2006 a 2009.

Ano	Ano	Município	Suscetíveis	Casos	Óbitos	Destruídos	Abatidos
2006	CE	Caucaia	172	05	05	0	167
		Ibiapina	10	01	01	0	09
		Coreaú	103	61	56	47	0
		Sobral	44	03	03	41	0
		Tianguá 1	155	45	45	110	0
		Tianguá 2	26	04	03	23	0
		Tianguá 3	02	01	0	01	0
	PB	Cuitegi	170	66	49	121	0
2007	CE	Caucaia	41	03	03	38	0
2008	MA	Barra do Corda	35	12	12	23	0
2009	RN	Macaíba	120	120	118	02	0
	AP	Macapá	60	06	06	54	0
	RN	Macaíba	301	74	74	227	0
	PA	Marajó	44	01	0	44	0
	AP	Macapá	04	02	02	02	0
	RN	Jurucutu	20	17	14	06	0
	AP	Macapá	18	03	03	15	0
	PA	Marajó	200	04	0	200	0

Fonte: OIE (2015)

Os suínos domésticos e selvagens são os hospedeiros e únicos reservatórios do vírus, independente da idade e sexo (OIE, 2008). Além dos suínos, outras espécies são susceptíveis tais como: equinos, bovinos, bubalinos, cervídeos, caprinos, coelhos, cães e gatos (OIE, 2008). Em laboratório o VPSC pode se replicar em vários animais como cobaias e camundongos (LIEBERMANN, 1988).

A transmissão do VPSC ocorre, principalmente, de forma horizontal dentro da mesma população, preferencialmente pelo contato direto ou indiretamente pela ingestão de alimentos contaminados e fômites contaminados. A transmissão vertical possui importância epidemiológica nas criações suínas de produção de leitões, nas formas de evolução crônica ou atípica (FLORES, 2007).

A disseminação do vírus ocorre de forma direta ou indireta, porém o contato direto entre animais, pelas secreções, excreções, sêmen ou sangue, tem importância nos surtos e em áreas nas quais a PSC ocorre de modo enzoótico (LIEBERMANN, 1988; OIE, 2008), podendo haver interferência da virulência da amostra como fator facilitador da transmissão pelas secreções e excreções (WEESENDORP et al., 2011).

A introdução do vírus em uma criação pode ocorrer pela introdução de animais portadores, com a forma crônica da doença, com forma atípica ou com infecção latente, sem manifestação clínica (WEESENDORF et al., 2011). A transmissão direta pode ainda ocorrer pela cópula e inseminação artificial, se o sêmen utilizado for proveniente de varrão infectado que esteja eliminando o vírus pelo sêmen (FLOEGEL et al., 2000).

A transmissão por via indireta pode ocorrer de diversas maneiras, o vírus pode ser disseminado por fômites; veículos; carregado por pessoas, como visitantes, veterinários, comerciantes e outros. Esta forma de transmissão é importante para a disseminação do vírus de uma criação para outra, entre regiões, estados e mesmo entre países (LIEBERMANN, 1988; OIE, 2014). Dentro de uma criação a transmissão indireta pode ocorrer principalmente pela contaminação de fômites, água e alimentos (LIEBERMANN, 1988; RIBBENS et al., 2004; OIE, 2014).

A transmissão vertical pode ocorrer por via transplacentária, podendo originar animais persistentemente infectados ou com anomalias congênitas (LIEBERMANN, 1988; OIE, 2008). Experimentalmente foi verificado que cabras gestantes infectadas com o VPSC transmitem o agente aos fetos, com presença do vírus na placenta e âmnion (SHIMIZU; KUMAGAI, 1989).

O VPSC pode persistir em suídeos selvagens, podendo ser um fator de risco importante para a continuação de surtos em suínos domésticos nas áreas afetadas, dificultando o controle e a erradicação da doença, como foi verificado na Alemanha com persistência do genótipo 2.3 do VPSC (LEIFER et al., 2010) e na Itália e Sardenha, com os subgrupos 1.1. e 2.3, enzoóticos em javalis (BIAGETTI; GREISER-WILKE; RUTILI, 2001), que foram incriminados na disseminação para suínos domésticos (LOWINGS et al., 1999).

Os índices de morbidade, mortalidade e letalidade na PSC são altos nas infecções agudas, com índice de letalidade que pode se aproximar a 100%. Estes índices são menores nos casos subagudos e nas infecções crônicas, geralmente fatais, porém afetando apenas poucos animais do plantel. A idade e o estado imune dos animais podem afetar o curso da doença, diminuindo o índice de mortalidade, de modo mais pronunciado em animais adultos,



que em animais jovens (DEPNER et al., 1995; WEESENDORF et al., 2009; OIE, 2008, BLOME et al., 2010).

### **3.3. Patogenia**

As principais portas de entrada do VPSC são as vias orais e nasais. Após a penetração, há colonização viral nas tonsilas, tendo-se verificado em infecção experimental que o vírus é detectado nas tonsilas 24 horas após a infecção, com início de excreção viral nasal e retal aos três dias após a infecção (OPHUIS; MORRISSY; BOYLE, 2006). Dois a três dias após a infecção o VPSC pode ser detectado nas células das criptas e da superfície das tonsilas e nas células endoteliais dos vasos das tonsilas (NARITA et al., 1999), nos linfonodos submandibulares, baço, linfonodos mesentéricos e ilíacos (NARITA et al., 1999; OPHUIS; MORRISSY; BOYLE, 2006; DURAND et al., 2009), podendo ser isolado nesse período do baço, rim, coração, cérebro e da musculatura estriada (DURAND et al., 2009). Posteriormente, há distribuição do vírus para diversos órgãos viscerais e finalmente para o pâncreas e cérebro (OPHUIS; MORRISSY; BOYLE, 2006), sendo também detectado nas células da mucosa do íleo, em macrófagos e linfócitos das placas de Peyer, nas células epiteliais dos ácinos e dos dutos pancreáticos (NARITA et al., 1999).

Em avaliação quantitativa da colonização do VPSC, a carga viral apresentou valores máximos no sangue e nos linfonodos mesentéricos, com valores decrescentes no linfonodo inguinal, pâncreas, baço, linfonodo submandibular, jejuno e íleo, pulmão, fígado, tonsilas, reto, válvula íleo cecal, rim, medula espinhal, esôfago, vesícula biliar, musculatura esquelética, estômago, cérebro, duodeno e a menor concentração foi verificada no coração (LIU et al., 2011).

Amostras virais de alta e moderada virulência tem a mesma distribuição no organismo (NARITA et al., 1999; DURAND et al., 2009), enquanto amostras de baixa virulência estão presentes apenas nas tonsilas, aos três, cinco e sete dias após infecção experimental, e nos linfonodos ileocecal e mesentérico, aos sete e oito dias após a infecção (DURAND et al., 2009). Animais infectados com cepas de baixa virulência podem não apresentar sinais clínicos, mas carrear e transmitir o vírus (MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003).

A disseminação do VPSC no organismo depende da idade do animal, virulência da amostra e dose infectante, podendo haver diferença na distribuição viral nas formas aguda e crônica e na infecção pré-natal (LIU et al., 2011). A dinâmica da excreção viral apresenta variação na dependência da virulência da amostra, curso da doença e número de passagens em

hospedeiros suscetíveis, ocorrendo maior eliminação viral em infecções por amostras altamente virulentas, na forma clínica aguda e após duas ou três passagens em hospedeiros suscetíveis, sendo estes animais, com alta excreção do VPSC, importantes na epidemiologia da doença (WEESENDORF et al., 2011).

Na PSC ocorre depleção linfocitária induzida por apoptose, sendo mais grave, ocorrendo em menor tempo e de maior intensidade pela ação de vírus de alta virulência (RENSON et al., 2009), atingindo tanto células B, como T do sangue periférico (SUMMERFIELD et al., 2001; WEESENDORF et al., 2011), com diminuição de linfócitos T, depleção de células ‘natural killers’ (NK) e de neutrófilos (SUMMERFIELD et al., 2001).

O VPSC também interfere na maturação e modulação dos monócitos e de células dendríticas (McCULLOUGH; RUGGLI; SUMMERFIELD, 2009; CHEN et al., 2012), importantes na modulação da resposta imune inata, que sofre interferência do VPSC, por meio de sua proteína não estrutural N<sup>pro</sup> que antagoniza a indução do interferon (IFN) tipo 1, promovendo degradação proteossomal de IFR3, fator regulador do IFN-gama, diminuindo a expressão mRNA de interleucina-10 (IL-10) e inibindo IL-12 (LA ROCCA et al., 2005; BAUHOFER et al., 2007; McCULLOUGH; RUGGLI; SUMMERFIELD, 2009; SEAGO; GOODBOURN; CHARLESTON, 2010; FIEBACH et al., 2011; CHEN et al., 2012). A severidade da doença depende da virulência da amostra, interferindo na cinética da resposta do hospedeiro à infecção, sendo forte e imediata com amostra altamente virulenta, e progressiva e retardada com vírus de virulência moderada, apesar de ambas interferirem na indução ou ação do interferon (RENSON et al., 2009).

Após infecção, anticorpos virais específicos não são detectados até três semanas, provavelmente isto se deve à forte leucopenia induzida pelo vírus. No entanto, suínos recuperados a partir de infecção, geralmente desenvolvem anticorpos neutralizantes persistindo durante toda a sua vida (VAN OIRSCHOT, 2003)

### **3.4. Sinais clínicos**

O período de incubação da PSC é variável, dependendo da virulência da amostra, dose infectante, via de transmissão e idade do animal, sendo geralmente de quatro a seis dias, podendo variar de dois a 20 dias, dependendo das condições de criação (LIEBERMANN, 1988; OIE, 2014).

A gravidade da infecção da PSC acredita-se ser determinada por diversos fatores, incluindo a virulência da estirpe bem como fatores relacionados ao hospedeiro e da virulência do vírus da PSC (MAYER et al., 2003).

As apresentações das manifestações clínicas, bem como a gravidade da PSC, são variáveis, no entanto, sua forma clínica tem sido classificada como infecções pós-natais, incluindo as formas hiperagudas, agudas e crônicas; infecções transplacentárias, que ocasionam infecções persistentes e alterações congênitas (VAN OIRSCHOT; TERPSTRA, 1989; FRÍAS LEPOUREAU; PERCEDO ABREU, 2003). A forma aguda da doença é mais prevalente em animais jovens, enquanto as formas subagudas e crônicas ocorrem mais em animais adultos e velhos (OIE, 2008).

Em geral, enquanto as infecções com estirpes de alta virulência resultam em doença hemorrágica aguda, a infecção causada por estirpes de baixa virulência pode se tornar crônica ou subclínica (FREY et al., 1980; VAN OIRSCHOT; DE JONG e HUFFELS, 1983).

A forma hiperaguda é observada raramente, podendo ocorrer por aplicação parenteral de vírus de alta virulência, e no início de um surto agudo, os animais podem apresentar colapso circulatório, hipertermia com valores que podem atingir 41,5°C de temperatura corporal e graves manifestações gerais de abatimento, marcha cambaleante, diarreia e hiperemia da pele, podendo o óbito ocorrer em algumas horas a alguns dias (LIEBERMANN; 1988; MOENNIG; FLOEGEL-WILKE, 2003; WEESENDORF et al., 2009).

Na forma aguda, observada com maior frequência nos casos de campo, produzida por amostra de alta virulência, o processo nosológico transcorre em alguns dias, geralmente variando de dois a 14 dias, com alta mortalidade, principalmente em animais jovens, ao exame clínico detecta-se hipertermia, geralmente entre 40,5°C e 41°C, raramente inferior ou superior a esses valores, sendo este um dos primeiros sinais clínicos da infecção. Os animais apresentam-se fracos, indiferentes, com inapetência ou anorexia, próximos uns aos outros ou amontoados; é comum a observação de conjuntivite catarral ou purulenta, às vezes rinite, dispnéia e tosse também podem ocorrer. Há o aparecimento de sintomatologia nervosa de origem central, com desorientação, marcha oscilante, andar sobre as pontas dos cascos ou sobre os boletos, cruzando as extremidades posteriores; letargia, ataxia, paresia, e com a evolução os animais podem apresentar espasmos e convulsões. Os transtornos circulatórios manifestam-se na pele, preferencialmente no focinho, orelhas, parte posterior do abdômen, face interna das extremidades, períneo e cauda, sob forma de hiperemia multifocal, hemorragias petequiais ou equimóticas e zonas irregulares de cianose (LIEBERMANN, 1988; NARITA et al., 1999; KADEN et al., 2000; NARITA et al., 2000; MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003; VIANA et al., 2007; BELÁK et al., 2008)

A forma subaguda da PSC é determinada, geralmente, pela infecção com amostras de virulência moderada, e os animais infectados apresentam quadros clínicos e patológicos

similares aos observados na forma aguda, porém com menor gravidade, tanto dos sinais e sintomas clínicos, como das alterações macro e microscópicas, e o curso clínico pode durar 20 a 30 dias (NARITA et al., 1999; NARITA et al., 2000; MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003; BELÁK et al., 2008).

A forma crônica da doença é determinada pela infecção com amostras de virulência moderada ou baixa, ocorrendo na maioria das vezes em plantel com imunidade parcial ao vírus. Os animais apresentam sinais clínicos gerais de sonolência, depressão, apetite caprichoso, diminuição da quantidade de ração consumida, podendo apresentar anorexia, aspecto arrepiado, parada ou atraso no crescimento, hipertermia, que pode atingir 40°C a 41,5°C, de modo persistente ou intermitente, com variados intervalos de tempo, e diarreia, persistente ou intermitente, com duração de um mês ou mais. Os animais aparentemente se recuperam, podendo ocorrer reincidência do quadro, e no plantel pode haver aparecimento de animais com nanismo, natimortos e mortalidade precoce dos leitões. Nesta forma clínica é comum o aparecimento de infecções secundárias bacterianas ou virais, que tornam o quadro mais complexo e mais difícil de ser diagnosticado (NARITA et al., 1999; NARITA et al., 2000; VIANA et al., 2007; BELÁK et al., 2008; OIE, 2008).

A ocorrência de estirpes de VPSC baixa virulência no campo e seu papel na "síndrome porca grávida transportadora" e na infecção congênita do feto por via transplacentária têm sido descrita (AYNAUD et al., 1977; VAN OIRSCHOT, 1979), no entanto existe alguma controvérsia sobre a importância dessas infecções persistentes congênicas na disseminação do vírus (KADEN et al., 2005).

A forma congênita da PSC geralmente é produzida por amostras de baixa virulência, e depende do estágio da gestação. Esta forma pode determinar morte fetal, com consequente reabsorção ou mumificação fetal, mal formações de órgãos viscerais internos e sistema nervoso central, dependendo da idade do feto, podendo haver também ocorrência de aborto, ou se a gestação chegar a termo pode haver ocorrência de natimortos, nascimento de produtos fracos, com crescimento abaixo do normal, tamanho e peso abaixo do normal, fraqueza e tremores, podendo apresentar dermatite, conjuntivite, diarreia, ataxia ou paresia do posterior, podem ir a óbito em semanas ou meses ou sobreviverem mais de seis meses, embora dificilmente atinjam um ano de idade. Pode haver o nascimento de leitões imunotolerantes, com viremia persistente, sem produção de anticorpos, tendo estes animais importância epidemiológica por se constituírem em fonte de infecção para o plantel, pela excreção intermitente do vírus. As alterações patológicas podem ser diversificadas, consistindo de hipoplasia cerebelar, desmielinogênese do sistema nervoso central, microencefalia, hipoplasia

pulmonar, atrofia tímica, ascite, deformações da cabeça e das pernas e outras malformações, ou apenas diminuição no desempenho reprodutivo (KADEN et al., 2005; WEESENDORF et al., 2009).

### 3.5. Diagnóstico

Os métodos laboratoriais contemplam a detecção e identificação do agente etiológico no sangue e/ou órgãos e análises sorológicas de pesquisa de anticorpos séricos. Desta forma, o diagnóstico conclusivo da PSC fornece embasamento para a tomada de decisões no tocante às ações de controle e erradicação da doença (OIE, 2008).

Os testes de diagnósticos laboratoriais da infecção pelo PSC são realizados com o reconhecimento de sua relação com o vírus da diarreia viral bovina (DARBYSHIRE, 1960) e de acordo como manual de diagnóstico da União Europeia (ANONYMOUS, 2002) e o Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). O método de diagnóstico utilizado para identificar a infecção de VPSC é baseado na citopatologia e imunocoloração das células infectadas em cultura como anticorpo específico do VPSC (OIE, 2008).

Os métodos diretos utilizados para a confirmação da PSC são considerados como "Gold Standard", dentre eles destaca-se o isolamento do vírus (DEWULF et al., 2004); imunohistoquímica (CORNISH et al., 2005); ELISA direto (DE LAS MULAS; RUIZ-VILLAMOR; DONOSO, 1997) e reação de transcriptase reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR) (DENG; WANG; WARD, 2005). Enquanto que os métodos sorológicos para detecção de anticorpos contra o VPSC podem ser feitos pelo teste de vírus neutralização ou ELISA indireto (DE SMIT, 2000).

Os avanços tecnológicos facilitam os estudos de tipagem genética dos vírus com base na determinação e comparação das sequências de nucleotídeos em relação aos fragmentos dos genomas virais. Estes estudos podem ser utilizados para estabelecer a relação das diferentes cepas virais permitindo a classificação, além de fornecer subsídios para o entendimento da disseminação do vírus e identificar possíveis falhas nas estratégias de controle (PATON et al., 2000).

Neste sentido a RT-PCR é considerada como o mais sensível método *in vitro* para a detecção do VPSC em suínos infectados e é particularmente adequada para a detecção precoce do vírus (DEWULF et al., 2004, HANDEL et al., 2004). Esta técnica vem sendo utilizada nos últimos anos em estudos de tipagem genética para identificar as possíveis relações existentes entre os isolados que acometem os suínos nos surtos de PSC no mundo

inteiro (GREISER-WILKE et al., 1998; BARTAK et al., 2000; GREISER-WILKE, 2000; PATON et al., 2000; TITOV et al., 2015).

### **3.6. Controle e Prevenção**

Surtos de doenças de declaração obrigatória ocorrem regularmente em diversas partes do mundo, alguns com consequências para o setor agrícola como é o caso da PSC. Um surto de PSC causa grande impacto na economia de um país. Medidas de combate para evitar a disseminação do vírus, devem ser imediatamente aplicadas após adeteção dos primeiros casos. A duração de uma epizootia será importante, no entanto, os aspectos éticos deverão ser avaliados para decidir qual melhor estratégia a ser utilizada para o controle e prevenção da doença (PLUIMERS et al., 2002; SCUDAMORE; HARRIS, 2002). A maioria dos países erradica com êxito a PSC, com uso de abate sanitário e vacinação (VAN OIRSCHOT, 2003).

A erradicação do VPSC ocorreu em alguns países após a implementação de medidas sanitárias rigorosas, tais como: Austrália, Canadá, Nova Zelândia, Estados Unidos da América(EUA), e alguns Estados membros da União Europeia (EDWARDS et al., 2000; MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003).

Na União Europeia o controle e erradicação da PSC são baseados na Directiva 2001/89/ CE (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2001) e no Brasil as medidas de prevenção, controle e erradicação da PSC devem seguir as orientações e determinações do Plano de Contingência da Peste Suína Clássica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2004).

No Brasil o primeiro Programa de Combate à PSC foi instituído em 1980 (BRASIL, 1980), que foi reformulado posteriormente com suspensão da vacinação nos grandes centros produtores, criação de um cinturão de vacinação compulsória em torno dessas áreas, controle de trânsito e criação de fundos de indenização, iniciando o processo progressivo de zonificação no país (BRASIL, 1992). Em 1998 houve a suspensão da vacinação contra PSC em todo o território nacional, objetivando erradicar a doença por meio de novas estratégias, com rigorosas medidas de vigilância sanitária (BRASIL, 1998). As ações do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em relação à sanidade dos suínos e às medidas de controle e erradicação da PSC foram consolidadas com a criação do PNSS (BRASIL, 2004).

Mudança na regra, oficializada pela resolução 29 da OIE e aprovada pelos países membros em maio de 2013, altera a condição da peste suína clássica de doença de auto declaração para doença de reconhecimento oficial. Na situação anterior, cada país membro

poderia declarar seu território ou parte dele como livre da doença. Neste contexto no Brasil, através do Ministério da Agricultura, certificou apenas os estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo assim os primeiros estados brasileiros a conquistar reconhecimento pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), como área livre de PSC, onde os mesmos são responsáveis por 68% das exportações nacionais de suínos, porém as áreas auto declaradas livres, serão auditadas internacional (BRASIL, 2015).

Os estados brasileiros que possuem o reconhecimento nacional de zona livre da peste suína (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Rondônia, Acre e Distrito Federal), estão comprometidos a se adequar às exigências da OIE para também tentar obter o reconhecimento internacional. Os demais estados brasileiros fazem parte da área não livre, porém a meta do MAPA é que a enfermidade seja erradicada em todo o território nacional.

De acordo com o Plano de Contingência da Peste Suína Clássica (BRASIL, 2004), todos os casos suspeitos devem ser notificados ao MAPA, que providenciará visita de profissional médico veterinário de órgão oficial, que fará exame clínico nos animais da criação e dos animais suspeitos, além de avaliar as condições sanitárias da criação e coletar amostras para análise laboratorial. Em caso de confirmação da suspeita, a equipe de emergência será acionada, tomando as medidas adequadas determinadas pelo Plano de Contingência no foco, na zona interna de proteção e na zona externa de vigilância.

Para as áreas livres de PSC devem ser tomadas medidas que evitem a entrada do vírus, através de medidas de vigilância, controle de fronteiras, portos e aeroportos, impedindo a entrada de suínos, material de multiplicação e produtos derivados provenientes de regiões ou países, com foco, surto ou epizootia de PSC, ou quando a doença existir de modo enzoótico, de acordo com as informações e recomendações da OIE (OIE, 2008) e do MAPA (BRASIL 2004).

Em muitos países a PSC é controlada por vacinação, porém isso implica um custo contínuo, bem como restrições ao comércio com áreas livres de PSC. No entanto, uma política de vacinação profilática coerente e sistemática em situações endêmicas pode levar a um ponto de partida favorável para uma política de não vacinação e erradicação do vírus. No Brasil, a vacinação somente será realizada em situação excepcional, com risco de disseminação e a critério do serviço veterinário oficial, mediante plano específico, onde estão incluídas, entre outras medidas, a extensão e delimitação da área em que será efetuada a vacinação, categoria e quantidade estimada de suínos a serem vacinados e duração da vacinação, utilizando apenas

vacinas registradas no MAPA, produzidas sob controle do serviço veterinário oficial (BRASIL, 2004).

As vacinas contra PSC devem obedecer às recomendações da OIE (2008); as inativadas com vírus total não devem ser utilizadas. As vacinas com vírus vivo modificado devem utilizar amostras do VPSC que tenham sido atenuadas em culturas celulares ou em hospedeiro suscetível, não pertencente à família *Suidae*, produzidas em culturas de células ou em animais não suínos, devendo ser validadas quanto à identidade, esterilidade, pureza, segurança, não transmissibilidade, estabilidade e imunogenicidade (OIE, 2008). A elaboração de novas vacinas deve, além de proporcionar boa imunização e proteção contra desafio de amostras selvagens, visar o impedimento da transmissibilidade do vírus, tanto da amostra vacinal, como de vírus selvagem, que consiga se reproduzir no animal vacinado, promover imunização contra todos os genótipos do VPSC e permitir a diferenciação sorológica entre animais infectados e vacinados. Neste contexto pesquisas recentes têm utilizado novas amostras vacinais, como as amostras HCLV (ZHANG et al., 2011) e C (GRAHAM et al., 2012), pestivírus quimérico CP7E2alf (KÖNIG et al., 2011), vacina vetoriada por adenovírus expressando gene E2 do VPSC (SUN et al., 2011), vacina de subunidade, como a vacina com peptídeos da partícula viral (MONSÓ et al., 2011), vacina com o gene E2 produzido em leite de cabra (BARRERA et al., 2010).



## REFERÊNCIAS

- ANONYMOUS, Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for confirmation of classical swine fever. Commission decision 2002/106/EC, **Official Journal of the European Communities** L39:71–88, 2002.
- AYNAUD, J.M. et al. Swine fever: in vitro and in vivo properties of low virulent strains isolated in breeding farms having reproductive failures. In: Liess B, editor. Proceedings of the agricultural research seminar on Hog Cholera Hog Cholera Classical Swine Fever and African Swine Fever. **Commission of the European Communities**, Publication EUR 5904 EN, p.273–277, 1977.
- BARMAN, N et al. Classical Swine Fever in Wild Hog: Report of its Prevalence in Northeast India. **Transboundary and Emerging Diseases**. Epub ahead of print. 2014.
- BARRERA, M. et al. Early onset and long lasting protection in pigs provided by a classical swine fever E2 vaccine candidate produced in the milk of goats. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.133, n.1, p.25-32, 2010
- BARTAK, P.; GREISER-WILKE, I. Genetic typing of classical swine fever virus isolates from the territory of the Czech Republic. **Veterinary Microbiology**, v.77, p. 59-70, 2000.
- BAUHOFER, O. et al. Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. **Journal of Virology**, v.81, n.7, p.3087–3096, 2007.
- BEER, M. et al. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. **Animal Health Research Reviews**, v.16, n.1, p.33–39, 2015.
- BELÁK, K. et al. Comparative studies on the pathogenicity and tissue distribution of three virulence variants of classical swine fever virus, two field isolates and one vaccine strain, with special regard to immunohistochemical investigations. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, p.34, 2008.
- BIAGETTI, M.; GREISER-WILKE, I.; RUTILI, D. Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy. **Veterinary Microbiology**, v.83, n.3, p.205-215, 2001.
- BINTINTAN, I.; MEYERS, G. A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.12, p.8572-8584, 2010.
- BJÖRKLUND, H. et al. Phylogenetic comparison and molecular epidemiology of classical swine fever virus. **Virus Genes**, v.19, n.3, p.189-195, 1999.
- BLOME, S. et al. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe--retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.3-4, p.276-84, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 85.403, de 25 de novembro de 1980 (Institui o Programa de Combate à Peste Suína – PCPS – em todo o território nacional).

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 83, de 08 de outubro de 1992 (Aprova o Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica no território nacional - PCPS),1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 42, de 27 de agosto de 1998, situação revogada,Publicada no diário oficial 02/09/1998,seção 1, pagina 31. Ementa: Dispõe sobre a vacinação contra a peste suína clássica, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 47, de 18 de junho de 2004 (Aprova o Regulamento Técnico do Plano Nacional de Sanidade Suídea),2004.

BRASIL. 2015. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2015/05/oie-reconhece-rs-e-sc-como-zonas-livres-de-pestes-suina-classica> “ Acesso em 30/12/2015”

CHEN, L.J. et al. Classical swine fever virus suppresses maturation and modulates functions of monocyte-derived dendritic cells without activating nuclear factor kappa B. **Research Veterinary Science**, v.93, n.1, p.529-537, 2012.

COLLETT, M.S. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v.165, n.1, p.191-199, 1988.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES.2001.– **Council Directive 2001/89/EC on Community measures for the control of classical swine fever, 23 October**.Off. J. Eur.Communities, L 316, 5-35.

CORNISH, T.E. et al. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.2, p.110-117, 2005.

DARBYSHIRE, J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle.**Veterinary Record**, v.72, p.331, 1960.

DEWULF, J. et al. Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. **Journal of Virological Methods**, v.119, p.137–143, 2004.

DE ARCE, H.D. et al.Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba. **Virus Research**.v.112, n.1-2, p.123–131, 2005.

DE LAS MULAS, J.M.; RUIZ-VILLAMOR, E.; DONOSO, S. Immunohistochemical detection of hog cholera viral glyco- protein 55 in paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.1, p-10-16, 1997.

DENG, M.Y.; WANG, H.; WARD, G.B. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.6, p.574-578, 2005.

DENG, M.C. et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v.106, n.3-4, p.187-193, 2005.

DEPNER, K.R. et al. Classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) – experimental infection and viral persistence. **Deutscher Tierärztl Wochenschr**, v.102, n.10, p.381-384, 1995.

DE SMIT, A.J. Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: A review. **The Veterinary Quarterly**, v.22, p.82-188, 2000.

DURAND, B. et al. Comparison of viraemia- and clinical-based estimates of within- and between-pen transmission of classical swine fever virus from three transmission experiments. **Veterinary Microbiology**, v.135, n.3-4, p.196-204, 2009.

EDWARDS, S. et al. Classical swine fever: the global situation. **Veterinary Microbiology**, 73, p.103-119, 2000.

FIEBACH, A.R. et al. Classical swine fever virus N(pro) limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7. **Journal of Virology**, v.85, n.16, p.8002-8011, 2011.

FLOEGEL, G. et al. Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.1-2, p.109-16. 2000.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: EDITORA UFSM, 2007. 888p.

FREY, H.R. et al. Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. I. Virological and serological studies. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.27, p.154-164, 1980.

FRÍAS LEPOUREAU, M.T.; PERCEDO ABREU, M.I. Reconocimiento de la peste porcina clásica. Manual Ilustrado, FAO, 44p, 2003.

GRAHAM, S.P. et al. Challenge of pigs with classical Swine Fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity. **PLoS One**, v.7, n.1, e 29310, 2012.

GREISER-WILKE, I. et al. Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. **Journal of Virological Methods**, v.75, n.2, p.141-150, 1998.

GREISER-WILKE, I. et al. Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.1-2, p.17-27, 2000.

HANDEL, K. et al. Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and

high virulent strains of classical swine fever virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.132–138, 2004.

HEIMANN, M. et al. Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. **Journal of Virology**, v.80, p.1915-1921, 2006.

HOFMANN, M.A.; BRECHTBUHL, K.; STAUBER, N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5'- noncoding region. **Archives of Virology**, v.139, p. 217-229, 1994.

HORZINEK, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, v.3, p.1–5, 1991.

HULST, M.M.; MOORMANN, R.J. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. **The Journal of General Virology**, v.78, p.2779–2787, 1997.

JI, W, et al. Vaccination influences the evolution of classical swine fever virus. **Infection, genetics and evolution**, v.25, p.69–77, 2014.

KADEN, V. et al. Classical swine fever virus: clinical, virological, serological and hematological findings after infection of domestic pigs and wild boars with the field isolate "Spante" originating from wild boar. **Berliner und Münchenertierärztliche Wochenschrift**, v.113, n.11-12, p.412-416, 2000.

KADEN, V. et al. Classical swine fever (CSF) in wild boar: the role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF. **Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.52, n.4, p.161-164, 2005.

KONIG, M. et al. Classical swine fever virus– Independent induction of protective immunity by 2 structural glycoproteins. **Journal of Virology**, v.69, p.6479-6486, 1995.

KÖNIG, P. et al. Innocuousness and safety of classical swine fever marker vaccine candidate CP7\_E2alf in non-target and target species. **Vaccine**, v.30, n.1, p.5-8, 2011.

KING, A.M.Q. et al. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Virology Division of the International Union of Microbiological Societies (IUMS)). San Diego, Elsevier Academic Press. 2011.1375p,

LACKNER, T. et al. Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. **Journal of Virology**, v.79, p.9746-9755, 2005.

LA ROCCA, S.A. et al. Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine, fever virus involves the N-terminal protease, Npro. **Journal of Virology**, v.79, n.11, p.7239-7247, 2005.

LEIFER, I. et al. Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. **The Journal of General Virology**, v.91, p.2687–2697, 2010.

LIEBERMANN, H. Peste suína clássica. In: **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. Volume 1. J. BEER, ed., Livraria Roca Ltda. p.94-112. São Paulo, 1988.

LIN, M. et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. **Journal of Virology**, v.74, p.11619–11625, 2000.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), **Fields Virology**, 5th ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA..p. 1101–1152, 2007.

LIU, S. et al. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. **Journal of Virological Methods**, v.172, n.1-2, p.88-92, 2011.

LOWINGS, J.P. et al. Classical swine fever virus diversity and evolution. **The Journal of General Virology**, v.77, n.6, p.1311-1321, 1996.

LOWINGS, J.P. et al. Classical swine fever in Sardinia: epidemiology of recent outbreaks. **Epidemiology and Infection**, v.122, n.3, p.553-599, 1999.

MAPA, 2015 <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2015/05/oie-reconhece-rs-e-sc-como-zonas-livres-de-peste-suina-classica> “ Acesso em 30/12/2015”

MAYER, D. et al. Establishment and characterisation of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent. **Virus Research**, v.98, n.2, p.105-116, 2003.

McCULLOUGH, K.C.; RUGGLI, N.; SUMMERFIELD, A. Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, n.1-3, p.7-15, 2009.

MEUWISSEN, M.P. et al. A model to estimate the financial consequences of classical swine fever outbreaks: principles and outcomes. **Preventive Veterinary Medicine**, v.42, n.3, p.249–270, 1999.

MEYERS, G.; THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Advances Virus Research**. v.47, n.53, p.53-113, 1996.

MOENNIG, V.; FLOEGEL, N.G.; WILKE, G.I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. **Veterinary Journal**, v.65, n.1, p.11-20, 2003.

MONSÓ, M. et al. Peptide vaccine candidates against classical swine fever virus: T cell and neutralizing antibody responses of dendrimers displaying E2 and NS2-3 epitopes. **Journal of Peptide Science**, v.17, n.1, p.24-31, 2011.

NARITA, M. et al. Immunohistochemical detection of hog cholera virus antigen in paraffin wax-embedded tissues from naturally infected pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, n.3, p.283-286, 1999.

NARITA, M. et al. Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. **Veterinary Pathology**, v.37, n.5, p.402-408, 2000.

OIE. 2008. Terrestrial Manual. Chapter 2.8.3. Classical Swine Fever (hog cholera). p. 1092-1106. Disponível em: [www.oie.int](http://www.oie.int). Acesso: 20/12/2015.

OIE. 2014. Classical Swine Fever. OIE Terrestrial Manual 2014. Chapter 2.8.3. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2010/chapitre\\_csf.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/chapitre_csf.pdf). “Acesso em 14/01/2016”

OIE 2015 <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> “Acesso em 17/01/2016”

OIE.s.d. World Organisation for Animal Health, World Animal Health Information Database (WAHID) Interface, Disease timelines, Period 2005 to 2012, Disponível em [web.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_timelines&public\\_country\\_code=&firstyear=2005&lastyear=2012&submit=](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines&public_country_code=&firstyear=2005&lastyear=2012&submit=) “Acesso em 24/01/2016”

OPHUIS, R.J.; MORRISSY, C.J.; BOYLE, D.B. Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v.131, n.1, p.78-85, 2006.

PAN, C.H. et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. **Archives of Virology**, v.150, n.6, p.1101–1119, 2005.

PATON, D.J. et al. Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.159–174, 2000.

PEETERS, B. et al. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. **The Journal of General Virology**, v.78, p.3311- 3315, 1997.

PÉREZ, L.J. et al. Positive selection pressure on the B/C domains of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic areas under C-strain vaccination. **Infection, genetics and evolution**, v.12, p.1405–1412, 2012.

PLUIMERS, F.H. et al. Lessons from the foot and mouth disease outbreak in the Netherlands in 2001. **Revue Scientifique Technique**, v.21, n.3, p.711–721, 2002.

RENSON, P. et al. Acute induction of cell death-related IFN stimulated genes (ISG) differentiates highly from moderately virulent CSFV strains. **Veterinary Research**, v.41, n.1, p.7, 2009.

RIBBENS, S. et al. An experimental infection (II) to investigate the importance of indirect classical swine fever virus transmission by excretions and secretions of infected weaner pigs. **Journal of Veterinary Medicine, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.51, n.10, p.438-442, 2004.

- RISATTI, G. et al. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.468–471, 2005.
- RUMENAPF, T. et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus - further characterization and induction of protective immunity. **Journal of Virology**, v.65, p.589-597, 1991.
- RUMENAPF, T. et al. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. **Journal of Virology**, v.67, n.6, p.3288–3294, 1993.
- SAATKAMP, H.; BERENTSEN, P.; HORST, H. Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. **Veterinary Microbiology**, v.73, n.2, p.221, 2000.
- SAKODA, Y. et al. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant viruses mainly isolated in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.75-86, 1999.
- SCUDAMORE, J.; HARRIS, D.M. Control of foot and mouth disease: lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001. **Revue Scientifique Technique**, v.21, p.699–710, 2002.
- SHIMIZU, M.; KUMAGAI, T. Experimental infection of pregnant goats with swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v.20, n.3, p.207-214, 1989.
- SEAGO, J.; GOODBOURN, S.; CHARLESTON, B. The classical swine fever virus N<sup>pro</sup> product is degraded by cellular proteasomes in a manner that does not require interaction with interferon regulatory factor 3. **The Journal of General Virology**, v.91, n.3, p.721-726. 2010.
- STADEJEK, T. et al. Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in central Europe. **Virus Research**, v.52, p.195-204, 1997.
- SUMMERFIELD, A. et al. Depletion of CD4(+) and CD8(high+) T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.78, n.1, p.3-19. 2001.
- SUN, J.S. et al. Proteomic analysis of swine serum following highly virulent classical swine fever virus infection. **Virology Journal**, v.8, p.7. 2011.
- TAUTZ, N. et al. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. **Journal of Virology**, v.71, p.5415-5422, 1997.
- TAYLOR DJ. Classical swine fever (hog cholera). 1995. In: Taylor DJ, ed. Pig diseases, 6<sup>th</sup> ed. 1997.
- THIEL, H.J. et al. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. **Journal of Virology**, v.65, p.4705-4712, 1991.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), **Virology**, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p.1059-1073

TITOV, I.; TSYBANOV, S.; MALOGOLOVKIN, A. Genotyping of classical swine fever virus using high-resolution melt analysis. **Journal of Virological Methods**, v.224, p.53-57. 2015.

WANG, Z. et al. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. **Virology**, v.330, p.332–341, 2004.

WESTERGAARD, J.M. The classical swine fever in the EEC. In **Report on the Meeting of National Swine Fever Laboratories in the European Economic Communities**. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium. 1990. p. 4–6.

WESENDORF, E. et al. Effect of strain and inoculation dose of classical swine fever virus on within-pen transmission. **Veterinary Research**, v.40, n.6, p.59, 2009.

WESENDORF, E. et al. Transmission of classical swine fever virus depends on the clinical course of infection which is associated with high and low levels of virus excretion. **Veterinary Microbiology**, v.147, n.3-4, p.262-273, 2011.

WEILAND, E. et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. **Journal of Virology**, v.64, n.8, p.3563–3569, 1990.

WEILAND, F. et al. Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. **The Journal of General Virology**, v.80, p.1157–1165, 1999.

WENGLER, G. et al. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology**, v.2, p.223-233, 1995.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUYVER, E.P. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.291–306, 1989.

WISKERCHEN, M.; BELZER, S.K.; COLLETT, M.S. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. **Journal of Virology**, v.65, p.4508-4514, 1991.

VAN GENNIP, H.G. et al. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. **Vaccine**, v.20, p.1544–1556, 2002.

VAN OIRSCHOT, J.T. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. I. Clinical, pathological and virological observations. **Veterinary Microbiology**, v.4, p.117–132, 1979.



- VAN OIRSCHOT, J.T.; DE JONG, D.; HUFFELS, N.D. Effect of infections with swine fever virus on immune functions.II.Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. **Veterinary Microbiology**, v.8, p.81–95,1983.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Y C. TERPSTRA, C.: Hog cholera virus.En *Virus infections of porcines*.Editadopor M.B. Pensaert.Elsevier, 1989.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. **Veterinary Microbiology**, v.96, p.367-384, 2003.
- VAN RIJN, P.A. et al. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. **The Journal of General Virology**, v.77, n.11, p.2737-2745, 1996.
- VAN ZIJL, M. et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. **Journal of Virology**, v.65, n.5, p.2761-2765, 1996.
- VIANA, D.A. et al. Contribuição ao Diagnóstico Diferencial entre Peste Suína Clássica (PSC) e Salmonelose: Análise Patológica revela lesões-chave para determinação etiológica. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.2, p.1–13, 2007.
- XU, J. et al. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. **Journal of Virology**, v.71, p.5312-5322, 1997.
- ZHANG, X.J. et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification for visual detection of the HCLV vaccine against classical swine fever in China. **Journal of Virological Methods**, v.171, n.1, p.200-205, 2011.

## 5.ARTIGO

# ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (2001-2009): NOVO SUBGENÓTIPO - 1.5<sup>1</sup>

Silva, M. M N. F.<sup>2</sup>,.....

**ABSTRACT** – Silva, M.M.N.F.,... [ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (2001-2009): NOVO SUBGENÓTIPO - 1.5]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Rua D. Manoel de Medeiros S/Nº, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-030, Brasil. E-mail: [martanery.farias@gmail.com](mailto:martanery.farias@gmail.com)

### Abstract

The classical swine fever (CSF) is a highly contagious viral disease of pigs and wild boar, caused by a Pestivirus. The objective of this study was to conduct a phylogenetic analysis of viral samples isolated on Classical Swine Fever outbreaks in Brazil. Eleven viral isolates in CSF outbreaks in the period 2001 to 2009 were used in this study. The samples were submitted to RNA extraction and the full-length E2 gene of CSF virus (1.119 nucleotides) was amplified by PCR and sequenced. The sequences were analyzed by the programs contained in STADEN package and the phylogenetic analyses were performed by Neighbor Joining method with 1000 bootstrap replicates using the MEGA 6.6 program. The A06 and A19 isolates (both from the state of Maranhão) grouped with high level of confidence with strains belonging to subgenotype 1.1. The other Brazilian isolates (A02, A09, A15, A16, A20, A27, from Ceará; A05, from Rio Grande do Norte; A11 and A12, from Amapá) presented a different segregation pattern into the subgenotype 1.1, forming a separate group within genotype 1, subgenotype 1.5. It is emphasized that epidemiological and molecular studies should be conducted continuously in order to understand the dynamics of outbreaks and thus reduce the losses caused by this disease.

Keyword: Classical swine fever, virus, swine, phylogenetic study

### Resumo

Objetivou-se com este estudo realizar a análise filogenética de amostras virais isoladas em surtos de Peste Suína Clássica no Brasil. Foram utilizadas 11 amostras virais isoladas nos surtos de PSC no período de 2001 a 2009. Para a análise filogenética as amostras foram submetidas a extração do RNA seguida da reação de transcrição reversa-PCR (RT-PCR) direcionadas para amplificar a sequência completa (1.119

---

<sup>1</sup> Recebido em...

Aceito para publicação em ....

<sup>2</sup>Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Recife, PE 52171-030, Brasil. \*Autor para correspondência: [marta.silva@agricultura.gov.br](mailto:marta.silva@agricultura.gov.br)

nucleotídeos) do gene E2 do vírus. Para o estudo filogenético todas as amostras foram sequenciadas e as árvores filogenéticas foram realizadas pelo método de *Neighbor Joining* com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os isolados A06 e A19 (ambos do estado do Maranhão) agruparam com alto índice de confiança com as cepas pertencentes ao subgenótipo 1.1. Já os demais isolados (A02, A09, A15, A16, A20, A27, Ceará; A05, Rio Grande do Norte; e A11 e A12, Amapá), mostraram-se menos relacionados ao subgenótipo 1.1., formando um novo subgenótipo, designado 1.5. Ressalta-se que estudos epidemiológicos e moleculares devem ser realizados de forma contínua para que se entenda a dinâmica dos surtos de PSC e consequentemente reduzir as perdas ocasionadas por esta enfermidade.

Palavra-Chave: epidemiologia molecular; suídeos; VPSC.

## INTRODUÇÃO

A Peste Suína Clássica (PSC) é uma doença de notificação obrigatória à Organização Mundial da Saúde Animal (OIE 2015), que possui importância econômica por ser altamente contagiosa, acometendo suínos e javalis. A doença é enzoótica na América do Sul, América Central e algumas partes da Europa, Ásia e África (Desai 2010).

O vírus da PSC (VPSC) pertence ao gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* (King et al., 2012), possui a característica de ser pequeno, envelopado, RNA de filamento simples com sentido positivo e com o genoma de 12.5 Kb, o qual é delimitada por regiões não traduzidas 5'-terminal e 3'-terminal (5'- NTR, 3'-NTR) (Meyers&Thiel 1996). Em comum com todos os flavivírus, o genoma VPSC codifica as proteínas estruturais, incluindo a grande glicoproteína E2 (gp55), na metade 5' do genoma, e as proteínas não estruturais, incluindo NS5B, na extremidade 3'. Regiões não codificantes (NCRs) existem em ambas as extremidades 5'e 3' do genoma (Meyers&Thiel 1996).

O VPSC pode ser dividido em três genótipos (1, 2 e 3), que podem ser subdivididos em 10 subgenótipos (1.1,1.2,1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, e 3.4) (Paton et al. 2000). O subgenótipo 2.1 ainda pode ser subdividido em 2.1a, 2.1b (Pan et al. 2005), 2.1c (Jiang et al. 2013) e 2.1d (Zhang et al. 2015). Recentemente, a análise filogenética de amostras do VPSC isoladas em Cuba demonstrou a existência de um novo subgenótipo 1.4 (Postelet al. 2013).

Com os avanços das plataformas tecnológicas para sequenciamento do DNA bem como para análises das sequências, os estudos filogenéticos têm assumido importante papel para subsidiar o conhecimento da epidemiologia molecular, bem como o controle das doenças. A análise filogenética é um pré-requisito para o rastreamento de vírus e, portanto, permitir a aplicação de medidas de controle mais efetivas (Postelet al. 2012). Estudos de epidemiologia molecular recentes de alguns países endêmicos para PSC sugerem que o vírus em circulação no campo evoluiu sob a seleção positiva exercida pela resposta imune à vacina, conduzindo a novas variantes virais atenuadas que causam formas mais brandas da doença (Pérezet al. 2012, Ji et al. 2015).

Três regiões do genoma (150 nucleotídeos da região não traduzida 5'NTR, 190 nucleotídeos do gene E2 e 409 nucleotídeos do gene NS5B) do VPSC têm sido largamente empregadas para estudos filogenéticos, porém os comprimentos curtos das sequências representam um fator limitante para a

diferenciação de isolados estreitamente relacionados (de Arce et al. 2005, Pereda et al. 2005, Postel et al. 2012). Recentemente, tem sido sugerida a utilização da sequência completa do gene E2 (1.119 nucleotídeos) para análise filogenética de isolados de VPSC (Postelet al. 2012). O gene E2 está relacionado à glicoproteína do envelope, essencial para o processo de replicação (Van Gennipet al. 2002). A análise genética dessa região é importante inclusive do ponto de vista do desenvolvimento de vacinas com marcador, uma vez que induz imunidade protetora (Pérez et al. 2012).

No Brasil, o Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE) é o órgão responsável pelo diagnóstico viral da PSC. No período compreendido entre 1999 e 2009, foram realizados 51 isolamentos do VPSC, procedentes da região Norte, nos Estados do Amapá (4) e Pará (2), e na região Nordeste, nos Estados do Maranhão (1), Ceará (19), Rio Grande do Norte (15), Paraíba (4) e Pernambuco (6). Analisando-se a distribuição espacial dos focos, observou-se que não havia um padrão bem definido que permitisse elaborar hipóteses mais consistentes sobre a origem dos mesmos (Silva, 2012).

Neste contexto, a análise e monitoramento da evolução do vírus da PSC referente a região E2 são indicados para análises filogenéticas, avaliando os tipos e subtipos virais que circulam no Brasil. Desta forma, objetivou-se com este estudo realizar a análise filogenética de amostras virais isoladas em surtos de PSC no Brasil.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostras**

Foram selecionadas amostras de órgãos de suínos (baço, amígdala e linfonodo) positivos para o VPSC, pela técnica de isolamento viral em cultivo de célula PK15, representativas dos surtos ocorridos no Brasil entre os anos de 2001 e 2009, descritos por Silva (2012). Considerando a disponibilidade de material biológico, foram processadas para o estudo filogenético do VPSC 11 isolados originários dos focos de PSC nos estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE), Maranhão (MA) e Amapá (AP). Como controle foram adicionadas ao estudo três estirpes do VPSC - Brésicia, Alfort 19 e Alfort 187.

### **Extração do RNA total e RT-PCR**

As amostras foram submetidas ao processo de extração do RNA viral utilizando o kit QIAamp® Viral RNA, segundo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi submetido à reação de Transcrição Reversa-PCR (RT-PCR) em uma única etapa, utilizando o kit QIAGEN® OneStep RT-PCR. O gene E2 do VPSC foi amplificado por PCR para o estudo filogenético, seguindo a seguinte estratégia: (a) amplificação de fragmento de 190 nucleotídeos do gene E2 preconizado pela OIE para classificação de VPSC usando os primers P5-P7; (b) amplificação da sequência completa do gene E2 de VPSC (1119 nucleotídeos) usando as combinações de primers P5-P7, P9-P6 e P8-P6. Os primers utilizados foram descritos previamente por Postelet al. (2012). Observa-se na Figura 1 a metodologia adotada.

### **Sequenciamento e análise filogenética**

O estudo filogenético foi conduzido a partir de cDNA obtido pela RT-PCR de RNA viral contido em amostras de necropsia ou com baixa passagem em cultivo celular para minimizar a interferência de algum tipo de seleção de genótipos virais após o cultivo celular. Desta forma, as sequências obtidas correspondem, o mais próximo possível, às sequências dos genótipos virais envolvidas nos surtos.

As amostras amplificadas foram sequenciadas utilizando o kit

*BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Life Technologies) em sequenciador automático ABI PRISM 3500 (Life Technologies).

As sequências geradas foram analisadas para análise de confiança das sequências e montagem dos *contigs* utilizando os programas contidos no pacote STADEN (Staden, 1996). Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de referência depositadas no *GeneBank* (Tabela 1) pelo programa CLUSTALW e a árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor Joining* com 1000 réplicas de *bootstrap* utilizando o programa MEGA 6.06 (Tamura et al. 2011). Para confirmar um agrupamento distinto dos isolados, o mesmo conjunto de sequências foi também analisado pelo método de Máxima Verossimilhança.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo filogenético observou-se que os isolados A06 e A19 (ambos do estado do Maranhão) agruparam com alto índice de confiança com as cepas Alfort 187 e Alfort A19, pertencentes ao subgenótipo 1.1. Já os demais isolados (A02, A09, A15, A16, A20, A27, Ceará; A05, Rio Grande do Norte; e A11 e A12, Amapá), mostraram-se menos relacionados aos representantes do subgenótipo 1.1., formando um grupo separado dentro do genótipo 1, subgenótipo 1.5 (Figura 2). A segregação entre os isolados brasileiros e os isolados dos subgenótipos 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4 foi suportada por altos valores de *bootstrap* indicando uma alta significância estatística. De acordo com Topfer et al. (2013) o VPSC é um RNA vírus que utiliza para replicação uma RNA polimerase que não realiza “proof-reading repair”, o que pode levar a alta taxa de mutação durante a replicação viral, inclusive ao surgimento de quasespécies.

As sequências também foram analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança e a árvore resultante mostrou agrupamento similar com a mesma segregação dos isolados brasileiros. Análises mais aprofundadas, como por exemplo, análise de distância genética e análise das sequências de nucleotídeos da região 5’NTR-E2 do genoma do VPSC (Postel et al. 2013), deverão ser realizadas para dar mais robustez à classificação dos isolados em um novo subgenótipo.

Considerando a distribuição geográfica, constatou-se que os isolados do estado do Maranhão foram classificadas no subgenótipo 1.1, enquanto que as demais da região nordeste (Ceará e Rio Grande do Norte) foram agrupadas no subgenótipo 1.5, juntamente com as do Amapá, da região Norte. Trabalho anterior de análise filogenética de isolados brasileiros do VPSC, utilizando um fragmento de 190 nucleotídeos do gene E2 do VPSC, classificou as amostras como pertencentes ao genótipo 1.1, sem informações sobre o estado de origem dessas amostras nem sobre os focos, há apenas a informação de que duas são dos anos 1987 e 1995 (Pereda et al. 2005).

Os focos de origem das amostras (Rio Grande do Norte, Ceará, Maranhão e Amapá) eram caracterizados por elevada letalidade, com quadro clínico e anatomopatológico compatível com a forma aguda típica da PSC (Silva 2012), indicando a circulação de amostra viral de alta virulência. O achado do genótipo 1 do VPSC associado a esses focos corrobora com a informação de que o genótipo 1 está associado a cepas de alta virulência, enquanto que os genótipos 2 e 3 estão associados a cepas de moderada e baixa virulência (Leifer et al. 2011). Adicionalmente parece não haver diferença marcante de virulência entre os subgenótipos 1.1 (amostras A06 e A19, do estado do Maranhão) e 1.5 (demais amostras dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Amapá).

No presente trabalho foi utilizada a sequência completa do gene E2 para análise filogenética do VPSC. Embora outras regiões tenham sido utilizadas para classificação do VPSC, como as regiões referentes aos genes NS5B e 5'NTR (Paton et al. 2000, Blacksell et al. 2004, Sarma et al. 2011), sequências completas de E2 mostraram ser as mais adequadas para filogenia. Além disso, sequências mais longas compreendendo parte da região 5'NTR e as regiões que codificam as proteínas virais  $N^{pro}$ ,  $C$ ,  $E^{ns}$ , E1 e E2 (designado 5'NTR-E2) também têm sido utilizadas para análise filogenética de isolados de VPSC. Contudo, a sequência completa de E2 mostrou ser mais adequada para obter uma filogenia viável, estatisticamente significativa e com resultados tão bons quanto os obtidos com as sequências 5'NTR-E2. Esta estratégia tem sido, portanto, recomendado pelo laboratório de referência OIE para a PSC, uma vez que fornece uma base sólida e melhorada para estudo da epidemiologia molecular do VPSC (Postelet al. 2012). Os estudos mais recentes têm empregado a sequência completa de E2 para os estudos filogenéticos e classificação de novos isolados do VPSC (Jiang et al. 2013, Postel et al. 2013, Bhaskar et al. 2015, Zhang et al. 2015).

É bem conhecido que o gene E2 de VPSC codifica a proteína mais imunogênica do envelope viral, que induz à produção de elevados títulos de anticorpos neutralizantes. As vacinas disponíveis são de dois tipos: vírus vivo atenuado por passagem em coelhos ou em cultivo celular e as de subunidade E2. A vacina mais comum é a cepa C (chinesa) lapinizada (Van Oirschot 2003, Suradhat et al. 2007, Beer et al. 2015). A vacinação de suínos no Brasil foi feita sistematicamente até 1991, porém a partir de 1992 foi progressivamente suspensa em todo território nacional. Entretanto, como medida de contenção de focos tem sido usado a vacinação com vacina viva atenuada para controlar os surtos de PSC, como foi o caso, em 2002, nos Estados do Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Freitas et al. 2007), e em 2009, no Amapá. Diante dessas circunstâncias é improvável que a vacinação tenha interferido de alguma forma na evolução genética das amostras estudadas, pois foram colhidas nos focos antes da vacinação.

Até recentemente acreditava-se que a diversidade genotípica do VPSC não comprometia a eficácia vacinal, desta forma, embora as cepas vacinais sejam derivadas do genótipo 1, protegem contra os grupos 2 e 3 (Van Oirschot 2003, Suradhat et al. 2007, Beer et al. 2015). Entretanto, uma amostra do VPSC foi isolada na China do soro de um animal de um rebanho imunizado e classificada como novo subgenótipo – 2.1d. (Zhang et al. 2015). Apesar de não haver a informação de qual tipo de vacina havia sido usada no rebanho, é sabido que as vacinas empregadas na China são todas produzidas com a amostra C (Luo et al. 2014). O isolamento do VPSC de um rebanho imunizado sugere que a vacinação não induziu proteção contra o subgenótipo 2.1d. Diante da constatação da existência do subgenótipo 1.5 do VPSC no Brasil, será necessário avaliar até que ponto a divergência entre esse genótipo e o vacinal, sobretudo amostra C, pode interferir na proteção de suínos vacinados, quando expostos ao subgenótipo 1.5. Há de ser considerado que nos focos estudados, após a realização deste estudo, o controle da PSC foi feito com a eliminação de animais e vacinação sistemática, o que indica que a vacinação teve ação protetora.

O diagnóstico da PSC geralmente é feito pelo isolamento em linhagens celulares permissivas e sua identificação pela pesquisa de antígenos virais, através da imunofluorescência ou imunoperoxidase, empregando anticorpos policlonais ou monoclonais (MAbs), ou pela pesquisa do RNA viral, pela RT-PCR. A caracterização dos isolados pode ser feita por sequenciamento parcial do cDNA ou por MAbs. A RT-PCR tem sido cada vez mais empregada, tanto para a detecção do agente, quanto para diferenciação de outros

pestivírus (OIE 2015). Dentre essas alternativas para diagnóstico da PSC as que poderiam ser afetadas devido a pequena variabilidade genética, como a observada no subgenótipo 1.5, são a RT-PCR e os ensaios com MABs. Uma vez que todos os isolados deste estudo foram identificados com MABs, seria necessário investigar como os isolados do subgenótipo 1.5 se comportam frente aos *primers* que estão sendo amplamente empregados na RT-PCR para diagnóstico da PSC.

Em conclusão, os resultados com base na análise da sequência completa do gene E2 mostraram a presença de isolados virais pertencentes ao subgenótipo 1.1, como já tinha sido relatado anteriormente, e apresentaram isolados brasileiros de VPSC que não podem ser atribuídos ao genótipo 1.1, mas formar um novo subgenótipodesignado subgenótipo 1.5. Desta forma, ressalta-se que estudos epidemiológicos e moleculares devem ser realizados de forma contínua para que se entenda a dinâmica dos surtos de PSC e consequentemente reduzir as perdas ocasionadas por esta enfermidade. Adicionalmente, é válido ressaltar que o gene E2 de VPSC codifica a proteína mais imunogênica do envelope deste vírus e, portanto, essa proteína é largamente utilizada em vacinas de subunidade contra o VPSC. Ou seja, uma análise detalhada da composição genética do gene E2 é importante para avaliação da eficácia das vacinas atualmente disponíveis e para o desenvolvimento de novas vacinas direcionadas para os isolados circulantes no país.

**Agradecimentos.-** Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em particular à Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL e ao LANAGRO-PE; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelos recursos financeiros e concessão de bolsas.

#### REFERÊNCIAS

- Beer M., Goller K.V., Staubach C. & Blome S. 2015. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. *Anim. Health Res. Rev.*16(1):33–39.
- Bhaskar N., Ravishankar C., Rajasekhar R., Sumod K., Sumithra T.G., John K., Mini M., Ravindran R., Shaji S. & Aishwarya J. 2015. Molecular typing and phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolates from Kerala, India. *Virus Dis.* 26(4):260–266.
- Blacksell S.D., Khounsy S., Boyle D.B., Greiser-Wilke I., Gleeson L.J., Westbury H.A. & Mackenzie J.S. 2004. Phylogenetic analysis of the E2 gene of classical swine fever viruses from Lao PDR. *Virus Res.* 104(1):87–92.
- de Arce H.D., Ganges L., Barrera M., Naranjo D., Sobrino F, Frías M.T. & Núñez J.I. 2005. Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba. *Virus Res.*112(1-2):123–131.
- Desai G.S., Sharma A., Kataria R.S., Barman N.N. & Tiwari A.K. 2010. 5'-UTR-based phylogenetic analysis of Classical swine fever virus, isolates from India. *Acta Virol.* 54(1):79–82.
- Freitas T.R.P., Esteves E.G., Oliveira A.M., Joineau M.E.G., Duarte A.C.S., Vargas I., Caldas L.A. & Rebello M.A. 2007. Classical Swine Fever in Brazil: study for the survey of classical swine fever outbreaks in Brazil from 1978 to 2004. *Semin.Cienc.Agrar.*28(2):277-286.
- Ji W., Guo Z., Ding N. & He C. 2015. Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus. *Virus Res.* 197:35–47,

- Jiang D.L., Gong W.J., Li R.C., Liu G.H., Hu Y.F., Ge M., Wang S.Q., Yu X.L. & Tu C. 2013. Phylogenetic analysis using E2 gene of classical swine fever virus reveals a new subgenotype in China. *Infect. Genet. Evol.* 17:231–238.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. (ed.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2012.
- Leifer I., Blome S., Beer M. & Hoffmann B. 2011. Development of a highly sensitive real-time RT-PCR protocol for the detection of Classical swine fever virus independent of the 5' untranslated region. *J. Virol. Methods.* 171(1):314–317.
- Luo Y., Li, S., Sun Y. & Qiu H. 2014. Classical swine fever in China: a minireview. *Vet. Microbiol.* 172(1-2):1–6.
- Meyers, G. & Thiel, H.J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 47(53):53–113.
- OIE. 2015. *Terrestrial Manual*. Chapter 2.8.3. Classical Swine Fever (hog cholera). p.1092–1106. Disponível em <[www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/classical\\_swine\\_fever\\_final.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/classical_swine_fever_final.pdf)>. Acesso em 05 Jan. 2016.
- Pan C.H., Jong M.H., Huang T.S., Liu H.F., Lin S.Y. & Lai S.S. 2005. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. *Arch. Virol.* 150(6):1101–1119.
- Paton D.J., Mcgoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J.Y., Liou P.P., Stadejek T., Lowings J.P., Bjorklund H. & Belak S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73(2-3):137–157.
- Pereda A.J., Greiser-Wilke I., Schmitt B., Rincon M.A., Mogollon J.D., Sabogal Z.Y., Lora A.M., Sanguinetti H. & Piccone M.E. 2005. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America. *Virus Res.* 110(1-2):111–118.
- Pérez L.J., Arce H.D., Perera C.L., Rosell R., Frias M.T., Percedo M.I., Tarradas J., Dominguez P. Núñez J.I. & Ganges L. 2012. Positive selection pressure on the B/C domains of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic areas under C-strain vaccination. *Infection. Infect. Gen. Evol.* 12(7):1405–1412.
- Postel, A.; Schmeiser, S.; Bernau, J.; Meindl-Boehmer, A.; Pridotkas, G.; Dirbakova, Z.; Mojzis, M. & Becher, P. 2012. Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences. *Vet. Res.* 43:50.
- Postel A., Schmeiser S., Perera C.L., Rodríguez L.J., Frias-Lepoureau M.T. & Becher P. 2013. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4. *Vet. Microbiol.* 161(3-4):334–338.
- Sarma D.K., Mishra N., Vilcek S., Rajukumar K., Behera S.P., Nema R.K., Dubey P. & Dubey S.C. 2011. Phylogenetic analysis of recent classical swine fever virus (CSFV) isolates from Assam, India. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34(1):11–15.
- Silva M.M.F. 2012. Diagnóstico da Peste Suína Clássica nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil no período de 1999 a 2009. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 45p. Disponível em <[http://200.17.137.108/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=1467](http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1467)>. Acesso em 10 de jan de 2016.
- Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5(3):233–241.



- Suradhat S., Damrongwatanapokin S. & Thanawongnuwech R. 2007. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet. Microbiol.* 17(119):1-9.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolution genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Bio. Evol.* 28(10):2731-2739.
- Töpfer A., Höper D., Blome S., Beer M., Beerenwinkel N., Ruggli N. & Leifer I. 2013. Sequencing approach to analyze the role of quasispecies for classical swine fever. *Virology.* 438(1):14-19.
- van Gennip H.G., Bouma A., Van Rijn P.A., Widjoatmodjo M.N. & Moormann R.J. 2002. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. *Vaccine.* 20(11-12):1544-1556.
- Van Oirschot V.J.T. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. 2003. *Veterinary Microbiology.* 96: 367-384.
- Zhang H., Feng L., Liu C., Chen J., Leng C., Bai Y., Peng J., Na T., Cai X., Yang X., Tian Z. & Tong G. 2015. Complete Genome Sequence of Classical Swine Fever Virus Strain JSZL, Belonging to a New Subgenotype, 2.1d, Isolated in China in 2014. *Genome Announc.* 3(4):e00833-15

### Legendas das Figuras



P5-P7= 750 nt

P9-P6= 791 nt

P8-P6= 700 nt

Figura 1. Estratégia para amplificação do gene E2 de VPSC para estudo filogenético.

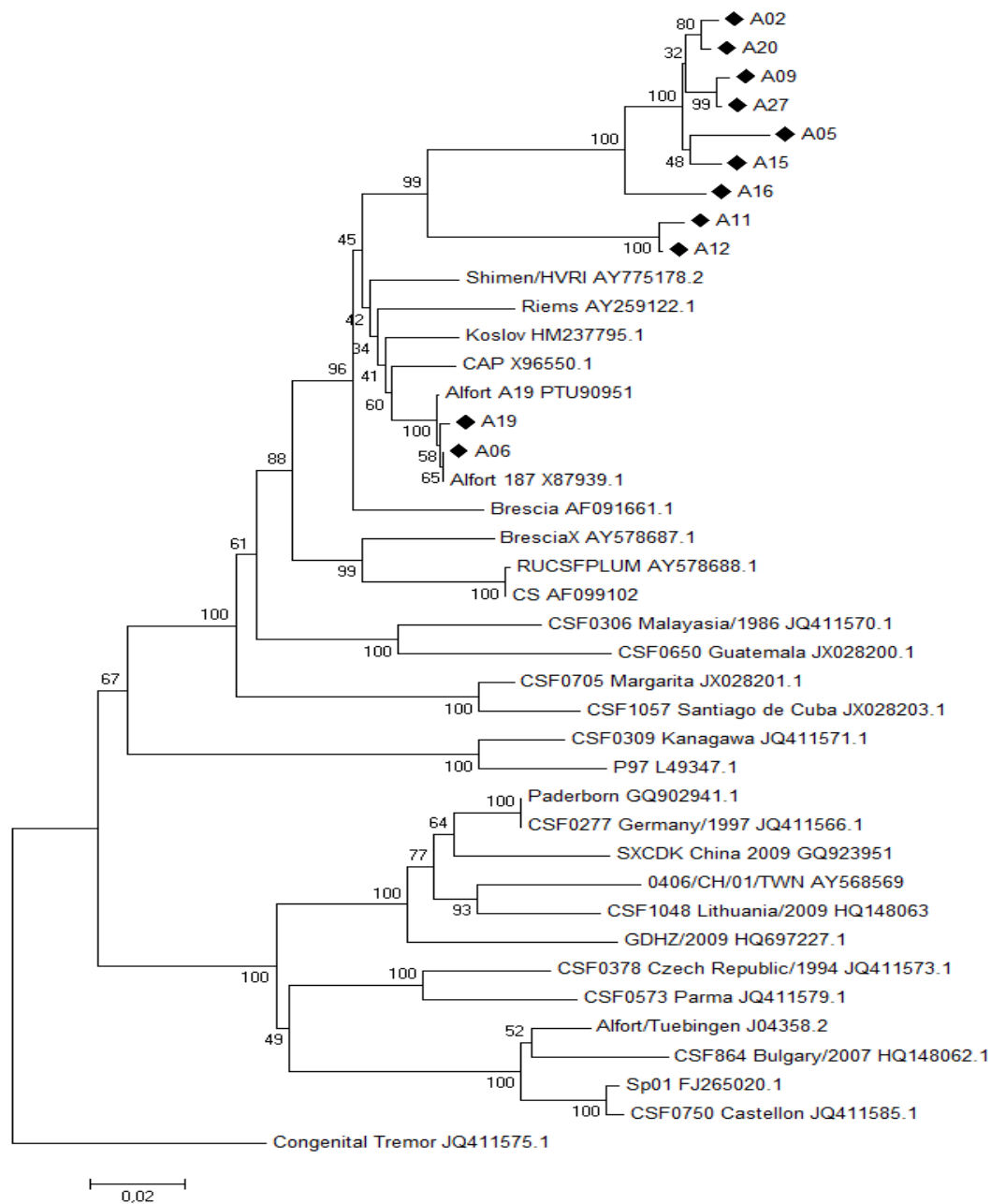


Figura 2. Árvore Filogenética dos isolados de VPSC pelo método de *Neighbor Joining*. Os isolados brasileiros do VPSC estão indicados pelo símbolo ◆. Os isolados A06 e A19 agruparam com alto índice de confiança com as cepas Alfort 187 e Alfort A19, pertencentes ao subgenótipo 1.1; os demais isolados (A02, A05, A09, A11, A12, A15, A16, A20 e A27), mostraram-se menos relacionados ao subgenótipo 1.1., formando um novo subgenótipo - 1.5.

### Legenda da Tabela

Tabela 1. Cepas de referência do vírus da Peste Suína Clássica depositadas no Gene Bank

<b>Nome do Isolado</b>	<b>Subgenótipo</b>	<b>Número de acesso</b>
Alfort/187	1.1	X87939.1
Alfort A19	1.1	PTU90951
Brescia	1.1	AF091661.1
Shimen/HVRI	1.1	AY775178.2
Riems	1.1	AY259122.1
Koslov	1.1	HM237795.1
CAP	1.1	X96550.1
BRESCIA X	1.2	AY578687.1
RUCSFPLUM	1.2	AY578688.1
CS	1.2	AF099102
Malayasia/1986	1.3	JQ411570.1
Guatemala	1.3	JX028200.1
Margarita	1.4	JX028201.1
Santiago de Cuba	1.4	JX028203.1
Paderborn	2.1	GQ902941.1
Germany/1997	2.1	JQ411566.1
China/2009	2.1	GQ923951
0406/CH/01/TWN	2.1	AY568569
Lithuania/2009	2.1	HQ148063
GDHZ.2009	2.1	HQ697227.1
CzechRepublic/1994	2.2	JQ411573.1
Parma	2.2	JQ411579.1
Alfort/Tuebingen	2.3	J04358.2
Sp01	2.3	FJ265020.1
Bulgary/2007	2.3	HQ148062.1
Castellon	2.3	JQ411585.1
Kanagawa	3	JQ411571.1
P97	3	L49347.1
Congenital Tremor	Grupo Externo	JQ411575.1