

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVIRUS SUÍ NO TIPO 2
(PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNO.**

Rovian Miotto

Concórdia, 2023

Rovian Miotto

**DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVIRUS SUÍ NO TIPO 2
(PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNOS.**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Janice Reis Ciacci Zanella
Coorientador (es): Caroline Pissetti e Luis Carlos Bordin

Concórdia, 2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

M669d Miotto, Rovian
DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVIRUS
SUIÑO TIPO 2 (PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUIÑO.
/ Rovian Miotto; orientadora Janice Reis Ciacci
Zanella; coorientadora Caroline Pissetti;
coorientador Luis Carlos Bordin. -- Concórdia, 2023.
42 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, , Concórdia, 2023.

Inclui referências.

1. Genotipagem. 2. PCR. 3. PCV2a. 4. PCV2b. 5.
PCV2d. I. Zanella, Janice Reis Ciacci , II.
Pissetti, Caroline . III. Bordin, Luis Carlos . IV.
Instituto Federal Catarinense. . V. Título.

Rovian Miotto

**DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVIRUS SUÍ NO TIPO
2 (PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNOS.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 11/04/2023

Banca examinadora:

Prof. Dra. Janice Reis Ciacci Zanella (Orientador)
Doutora em Virologia Veterinária pela Universidade de Nebraska- EUA
Instituição de vínculo: Embrapa Suínos e Aves.

Prof. Dra. Giseli Aparecida Ritterbusch
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Instituição de vínculo: Universidade de Passo Fundo (UPF)

Dr. Paulo Augusto Esteves
Doutor em pela Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituição de vínculo: Embrapa Suínos e Aves



Emitido em 11/04/2023

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 3648/2023 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 03/05/2023 17:08)

JANICE REIS CIACCI ZANELLA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.306-##

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **3648**, ano: **2023**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **03/05/2023** e o código de verificação: **bae6f4702d**

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais, que são os meus exemplos, Jairo Miotto e Rosilei Mocelin Miotto, ao meu irmão Jordan Miotto e a meus avós. Muito obrigado por terem tornado tudo isso possível, e por todo o esforço e dedicação prestados. Tenho muito orgulho e admiração por vocês! Gostaria de agradecer ainda a meus tios, Vanderlei e Sandra, ainda meu primo Jonathan por terem me recebido tão bem na sua casa, me fornecendo todo apoio necessário, vocês foram fundamentais nessa caminhada.

Agradeço aos meus ex-colegas de faculdade e agora colegas de profissão Isabelle Sgorla, Márcio Cristiano, Mariana Rovaris e Paulo Sergio Mayer que sempre estiveram me apoiando durante o período de mestrado, não me deixando desistir e me incentivando sempre que possível. Gostaria de agradecer os membros da banca a Dra. Giseli e também ao Dr. Paulo por terem aceitado fazer parte deste momento importante em minha carreira profissional.

Em especial agradecer minha orientadora a Dra. Janice Ciacci Zanella por todo apoio, por ter topado este desafio deste projeto e com certeza sem você, nada disso teria acontecido. Agradecer também a Carol Pissetti por todo apoio e por ter me fornecido as amostras de DNA para que este projeto fosse possível de acontecer.

Agradeço à EMBRAPA Suínos e Aves de Concórdia por ter me dado a oportunidade de realizar minha pesquisa em suas dependências, assim estendo meus agradecimentos em especial ao pessoal da Virologia de suínos, no qual fiquei maior parte do tempo em contato, em especial gostaria de agradecer a Neide Simon por ter me ajudado em tudo que foi necessário, abdicando muitas vezes de suas obrigações. Enfim agradecer a todas as pessoas da EMBRAPA que se fizeram presentes nesta caminhada, com certeza vocês foram muito importantes no meu desenvolvimento pessoal e profissional. Também gostaria de agradecer o pessoal da bacteriologia de suínos por todo companheirismo e apoio nestes últimos meses. Agradecer também meus dois grandes amigos José Victor Braga e Jean Faccin pela parceria e por todo apoio.

Agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de estudos.

Epígrafe

"Se você não gosta do seu destino, não o aceite. Em vez disso, tenha a coragem para transformá-lo naquilo que você quer que ele seja."

-Naruto Uzumaki

Resumo

MIOTTO, Rovian **Detecção De Diferentes Genótipos De Circovirus Suí no Tipo 2 (PCV2) Em Amostras Clínicas De Suí no. 2023. 42f.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2023.

A circovirose suína é uma das doenças da produção que mais impacto gera na suinocultura comercial. É causada pela infecção de um vírus, o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Os PCV2 são vírus resistentes, pequenos, de genoma DNA circular, todavia apresentam elevada taxa de mutação, semelhante aos vírus de genoma RNA. Atualmente existem 4 tipos de PCV identificados: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4. O PCV2 é classificado em 9 diferentes genótipos (a-i). A circovirose não é uma doença nova, mas sua apresentação mudou nos últimos anos, principalmente após a ampla utilização de vacinas comerciais para PCV2. E o PCV2 tem evoluído geneticamente, o que leva a necessidade de monitorar rebanhos vacinados quanto a aspectos clínicos e genotípicos. Neste trabalho, foram analisadas 333 amostras clínicas de suínos positivas para PCV2. As amostras eram de diversos tecidos, de vários estados do Brasil e de diferentes fases de produção. O objetivo foi padronizar uma reação de PCR convencional que fosse de baixo custo e de fácil acesso, visando genotipar os três principais genótipos existentes atualmente, sendo PCV2a, PCV2b e PCV2d, inclusive identificar as infecções dos diferentes genótipos do PCV2 e também as infecções com PCV3. Os controles positivos da reação foram obtidos através de sequenciamento de amostras selecionadas aleatoriamente. Do total de amostras analisadas, foi possível genotipar 266 delas. O genótipo mais frequente nas amostras estudadas foi o PCV2b, ocorrendo em 56,77% das amostras positivas, principalmente em amostras de creche. Contudo, o PCV2d estava presente em 33,10% das amostras, principalmente em amostras de suínos de terminação e nas amostras obtidas de matrizes. Todas as amostras recebidas foram positivas para PCV2b, o que comprova que o PCV2b causa doença sistêmica em suínos. O PCR desenvolvido ao ser comparado com um kit comercial foi eficaz e apresentou ótimos resultados em genotipagem do PCV2. Com esse estudo, pode-se notar que o PCV2b continua sendo o mais prevalente nas granjas de suínos no Brasil e continua causando problemas na suinocultura. Importante ressaltar que no Brasil, a maioria das vacinas comerciais são para o PCV2a, indicando a importância de se realizar o diagnóstico adequado e estudar a necessidade da atualização das vacinas para os genótipos que estão circulando atualmente, mesmo que a vacina para PCV2a forneça proteção heteróloga para os outros genótipos. Desta forma, a PCR desenvolvida aqui é uma ferramenta rápida e de relativo baixo custo para ser utilizada.

Palavras-chave: Genotipagem; PCR; PCV2a; PCV2b; PCV2d.

Abstract

MIOTTO, **Detection of Different Genotypes of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Clinical Samples of Pigs..** 2023. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2023.

Porcine circovirus disease (PCVD) is one of the most impactful diseases in commercial pig production. It is caused by the infection of a virus, Porcine circovirus type 2 (PCV2). PCV2 is a small, circular DNA virus that is highly resistant and has a high mutation rate, similar to RNA viruses. Currently, four types of PCV have been identified: PCV1, PCV2, PCV3, and PCV4. PCV2 is classified into 9 different genotypes (a-i). Although it is not a new disease, the presentation of PCVD has changed in recent years, mainly due to the widespread use of commercial vaccines for PCV2. PCV2 has also evolved genetically, requiring monitoring of vaccinated herds for clinical and genotypic aspects. This study analyzed 333 clinical samples of pigs that tested positive for PCV2 from various tissues, states in Brazil, and production phases. The objective was to standardize a low-cost, easily accessible conventional PCR reaction to genotype the three main genotypes of PCV2, namely PCV2a, PCV2b, and PCV2d. Additionally, the study aimed to identify co-infections of different PCV2 genotypes and co-infections with PCV3. Positive controls for the reaction were obtained through sequencing randomly selected samples. Of the total samples analyzed, 266 were genotyped. PCV2b was the most frequent genotype found, occurring in 56.77% of the positive samples, mainly in nursery samples. However, PCV2d was present in 33.10% of the samples, mainly in finishing pigs and in samples obtained from breeding sows. All samples received were positive for PCV2b, confirming that PCV2b causes systemic disease in pigs. The PCR developed in this study was compared to a commercial kit and proved to be effective, presenting excellent results in PCV2 genotyping. This study shows that PCV2b remains the most prevalent in pig herds in Brazil and continues to cause problems in pig farming. It is important to note that in Brazil, most commercial vaccines are for PCV2a, indicating the need to perform adequate diagnosis and study the need for updating vaccines for the genotypes currently circulating, even though the vaccine for PCV2a provides heterologous protection for other genotypes. Thus, the PCR developed here is a fast and relatively low-cost tool to be used.

Keywords: Genotyping; Circovirus; PCV2a; PCV2b; PCV2d;

Lista de Figuras

Figura 1- Estruturas do Circovirus. (A) Microscopia eletrônica, aumento de 250.000 vezes. (B) Visão tridimensional do PCV-2.	3
Figura 2. Organização do Genoma do PCV2 com as duas ORF's principais	4
Figura 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os componentes necessários e etapas.	8
Figura 4. Controles positivos de cada genótipo. PCV2a (277pb); PCV2b (277pb) e PCV2d (343pb) usando marcador de 100pb.	14
Figura 5. Primers utilizados no estudo de genotipagem	15
Figura 6. Porcentagem de amostras que foram passíveis de genotipagem e amostras que não foi possível encontrar genótipos.	16
Figura 7. Porcentagem de amostras positivas para cada genótipo e que apresentaram coinfeção.	16
Figura 8. Amostras recebidas e positivas por cada tipo de amostra e cada genótipo mais prevalente em cada amostras.	17
Figura 9. Amostras recebidas por cada Estado Brasileiro, demonstrando a positividade de das amostras e também genótipo mais presente em cada uma delas	18
Figura 10. Gráfico apresentando as diferentes fases de produção, com os genótipos mais positivos e o total de amostras positivas.	19
Figura 11. Gráfico apresentando as porcentagens de amostras com coinfeção entre os genótipos de PCV2 e a coinfeção entre PCV2 e PCV3.	20
Figura 12. Amostras genotipadas em cada um dos dois testes avaliados.	21
Figura 13. Teste estatístico de Kappa, e acurácia entre as genotipagens.	21

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE	1
1.1	HISTÓRICO.....	1
1.2	CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2)	2
1.3	DOENÇAS ASSOCIADAS AO PCV2	4
1.3.1	<i>Infecções subclínicas</i>	5
1.3.2	<i>Infecções Clínicas</i>	5
1.4	DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE PCV2	7
1.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	GERAL	9
2.2	ESPECÍFICOS.....	9
3	DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNOS	10
3.1	INTRODUÇÃO	10
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.2.1	<i>Comite de Ética</i>	12
3.2.2	<i>Obtenção das amostras</i>	12
3.2.3	<i>Controles Positivos</i>	13
3.2.4	<i>Reação de PCR para genotipagem</i>	14
3.3	RESULTADOS.....	15
3.3.1	<i>Coinfecções</i>	19
3.3.2	<i>Avaliação da concordância entre os dois testes</i>	20
3.4	DISCUSSÃO	22
3.5	CONCLUSÃO	25
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26

5	REFERÊNCIAS	27
----------	--------------------------	-----------

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

1.1 Histórico

Em 1974, foi identificado o primeiro circovírus suíno (PCV1) por pesquisadores na Alemanha, este sendo encontrado contaminando cultivo celular em linhagem de células renais de suínos (PK-15) (TISCHER; RASCH; TOCHTERMANN, 1974). O PCV1 foi classificado como não patogênico, devido aos animais experimentalmente infectados, não apresentarem sintomatologia clínica e alterações morfológicas compatíveis com a doença (ALLAN et al., 1995).

Na década de 90, um novo tipo de PCV foi associado a uma síndrome descoberta, a qual apresentava definhamento e perdas de suínos recém desmamados, assim foi denominada de Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) (ALLAN et al., 1998). Esta nova síndrome era causada por um PCV, similar ao PCV1, que foi denominado PCV2 (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). No Brasil, os primeiros casos de PCV2 foram descritos no ano de 2000 no estado de Santa Catarina (ZANELLA; MORES, 2000; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003), posterior a isso, foi se disseminando, sendo encontrado em todos os sítios de produção de suínos no Brasil.

O PCV2 evoluiu rapidamente nas últimas décadas. A primeira mudança ocorreu em 2003, do genótipo PCV2a para PCV2b, o qual se tornou mais comum, estando associado a um quadro mais grave da doença (CIACCI-ZANELLA, 2017). Em 2012, um mutante do genótipo PCV2b, conhecido como mPCV2b, foi isolado de rebanhos de suínos vacinados em todo o mundo, incluindo o Brasil, sendo mais tarde denominado PCV2d (KWON et al., 2017).

Em 2015 nos EUA, um novo PCV foi descoberto. Classificado como PCV3 causava sintomatologia respiratória, inflamação multissistêmica e cardíaca, falhas reprodutivas, e Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PNDS) (PALINSKI et al., 2017; PHAN et al., 2016). Ambos PCV3 e PCV2 apresentam sinais clínicos similares no suíno infectado, dificultando o diagnóstico (PALINSKI et al., 2017). Além disso, o

PCV3, é importante em coinfeções com outros vírus, como por exemplo PCV2 (VARGAS-BERMUDEZ; MOGOLLÓN; JAIME, 2022; WANG et al., 2020), diarreia epidêmica dos suínos (PEDV) (GUO et al., 2020), síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), peste suína clássica (CFSV) (CHEN et al., 2019), torque teno vírus (RITTERBUSCH et al., 2012) e com outras bactérias que afetam a produção de suínos (KIM et al., 2018).

Em Hunan, na China, em 2019 um novo PCV, denominado PCV4 foi descoberto por ZHANG et al., 2020, sendo identificado em amostras de soro de suínos. Os animais apresentavam sinais entéricos, respiratórios e, também, observou-se PDNS, diagnosticado em suínos clinicamente saudáveis e em animais doentes (VAN-GIAP NGUYEN et al., 2021), porém o PCV4 está restrito apenas ao continente Asiático (WANG et al., 2022). No Brasil até o presente momento não existem trabalhos que buscaram a identificação do PCV4 nas granjas de suínos.

1.2 Circovírus suíno Tipo 2 (PCV2)

Segundo OUYANG et al., 2019 o PCV2 é considerado um dos patógenos mais importantes na suinocultura atual, assim o PCV é um dos vírus mais estudados atualmente (SILVA; CASTRO, 2022).

O PCV2 está globalmente distribuído em quase 100% das granjas de suínos. Mas, atualmente, a maioria dos suínos são assintomáticos e a manifestação é subclínica (SEGALÉS, 2012). Até o momento 9 genótipos de PCV2 estão descritos na literatura (PCV2a a PCV2i) (FRANZO; SEGALÉS, 2018; WANG et al., 2020; YAO et al., 2019), isso se deve a alta taxa de mutação apresentada pelo vírus, comparado muitas vezes as taxas de mutação de vírus RNA (FIRTH et al., 2009).

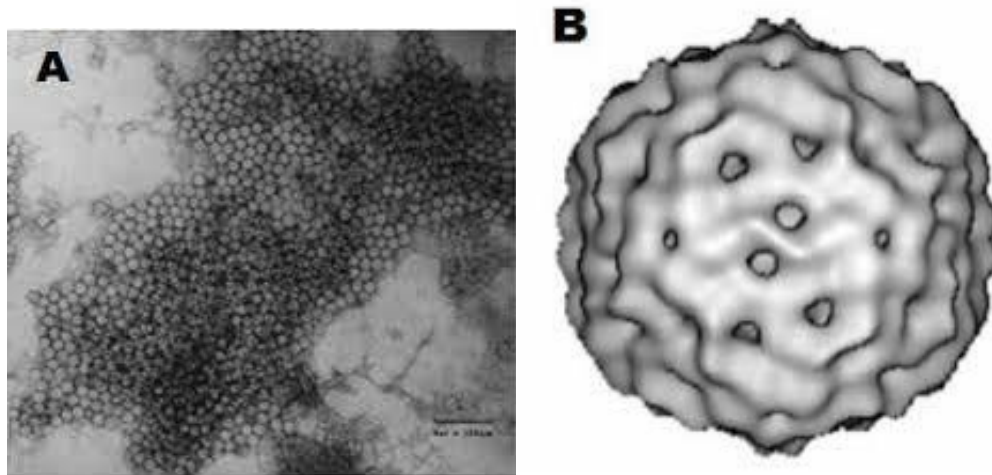


Figura 1- Estruturas do Circovirus. (A) Microscopia eletrônica, aumento de 250.000 vezes. (B) Visão tridimensional do PCV-2. Adaptado de DEZEN, 2007.

Como apresentado anteriormente, dentre todos os genótipos de PCV2 existentes, o PCV2a foi o primeiro descrito (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007), durante a década de 1990 até os anos 2000. O PCV2a, foi o mais prevalente nas granjas de suínos (KWON et al., 2017), causando diversos problemas para a suinocultura, sendo principalmente relacionado a SDMS. Já nos anos de 2003 a 2005 o PCV2a foi substituído pelo PCV2b, que também foi associado a surtos clínicos e altas taxas de mortalidade (CIACCI-ZANELLA, 2017). O PCV2 continuou evoluindo e, em 2012, um novo genótipo passou a ser descrito. Inicialmente denominado PCV2b mutante (mPCV2b) este vírus apresentava 3 aminoácidos extras no final da ORF-2 que codifica a proteína do capsídeo viral, e o vírus foi associado a falhas vacinais (CIACCI- ZANELLA et al., 2015). Desta forma, o PCV2b mutante foi reclassificado como PCV2d (CIACCI- ZANELLA et al., 2015; KWON et al., 2017), o qual vem se disseminando globalmente (FRANZO ID; SEGALÉS, 2018). Presentemente, este é o genótipo mais prevalente nas granjas de suínos de todo o mundo (KWON et al., 2017).

Quanto ao genótipo PCV2c, este foi apenas encontrado em amostras de suínos na Dinamarca e em suínos ferais no Brasil, não apresentando importância

clínica (DUPONT et al., 2008; FRANZO et al., 2015). O PCV2e foi encontrado primeiramente em amostras de suínos no México e em granjas na China (HARMON et al., 2015; LIU et al., 2018), tendo sido isolado por PARK; CHAE, 2021.

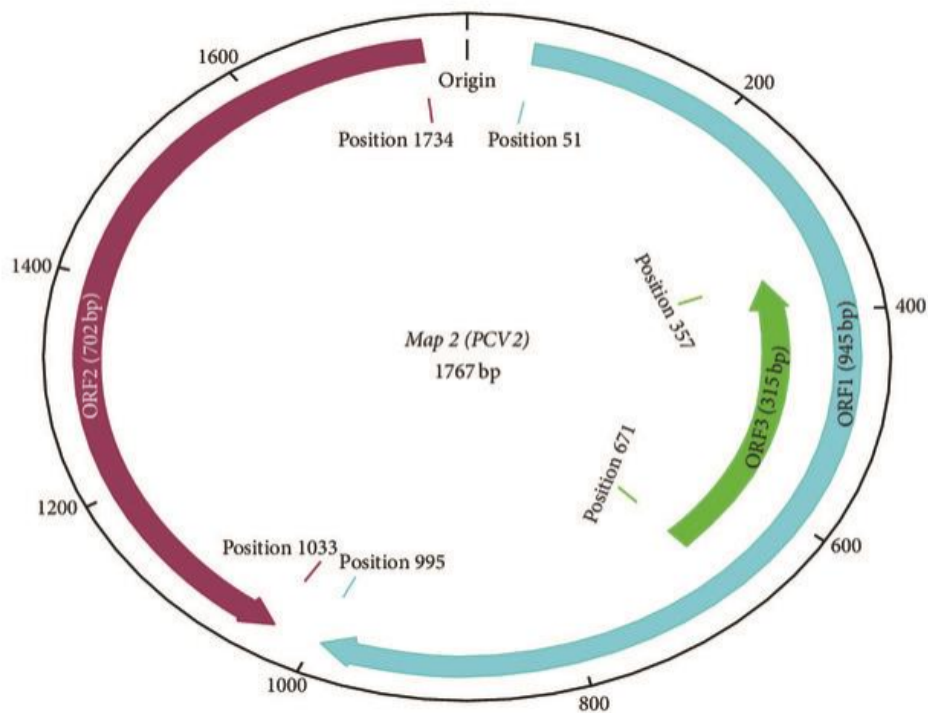


Figura 2. Organização do Genoma do PCV2 com as duas ORF's principais. Adaptado de ZHAI et al. 2014.

1.3 Doenças associadas ao PCV2

Diversas doenças estão associadas ao PCV2, as quais também podem ser classificadas em infecções subclínicas e infecções clínicas (SEGALÉS, 2012). Como é de conhecimento, o PCV2 possui como alvo primário de replicação os tecidos linfóides, causando infecção, lesão que pode se tornar mais severa pela coinfeção com outros patógenos (MENG, 2013).

1.3.1 Infecções subclínicas

O PCV2 é endêmico em todos os sítios de produção de suínos do mundo (OPRIESSNIG et al., 2020), e as infecções subclínicas são as mais prevalentes. Mesmo sem sinais clínicos característicos e perceptíveis da infecção de PCV2 nos suínos, as perdas em indicadores zootécnicos como ganho de peso, conversão alimentar, condição corporal, peso da carcaça, dentre outros são observados (SEGALÉS, 2012).

O PCV2 causa uma depleção do sistema linfóide devido ao tropismo primário do vírus, assim causando uma imunossupressão dos suínos acometidos (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004). A doença e os sinais clínicos podem ser exacerbados quando o animal apresenta coinfeções com outros patógenos, como o vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos suínos (PRRSV) (ALLAN et al., 1999), Parvovírus (PPV) (ALLAN et al., 1999), *Mycoplasma hyopneumoniae* (OPRIESSNIG et al., 2004), ou até mesmo outro genótipo do PCV, ou tipo como o PCV3 (KLAUMANN et al., 2018) ou PCV4 (SUN et al., 2021).

1.3.2 Infecções Clínicas

Algumas síndromes estão associadas a infecção pelo PCV2, como a síndrome do definhamento multissistêmico (SMDS), que é a de maior importância por causar perdas econômicas significativas para os produtores de suínos em todo o mundo (CHAE, 2005). Os sinais clínicos mais importantes são a caquexia, dispneia, linfadenopatia, diarreia, palidez e icterícia (HARDING et al., 1998).

A infecção pelo PCV2 pode causar doenças com outros sinais clínicos como as respiratórias que fazem parte do complexo de doenças respiratórias. Outras manifestações incluem falhas reprodutivas, enterite granulomatosa, linfadenite necrosante, epidermite exudativa e tremor congênito, que podem estar presentes nas granjas de suínos. Devido a isso, o termo "doenças sistêmicas associadas ao Circovírus Suíno (PCVAD)" passou a ser usado.

Este pode causar doença entérica em suínos, que se caracteriza por sintomas como diarreia, lesões de enterite granulomatosa e redução do tecido linfoide, incluindo as placas de Peyer, no intestino dos animais afetados (CIACCIZANELLA, 2017).

A infecção por PCV2 pode afetar a fertilidade, a gestação e a sobrevivência dos leitões, resultando em prejuízos significativos para a suinocultura (ZHANG et al. 2019). Pode ocasionar o aumento do número de abortos e natimortos, a diminuição da fertilidade e a redução no tamanho da leitegada, a infecção por PCV2 pode afetar a qualidade do sêmen em machos suínos, reduzindo a fertilidade e a taxa de sobrevivência dos leitões, e o PCV2 pode causar abortos e diminuir o peso dos leitões ao nascer, além de aumentar a mortalidade neonatal (SHI et al., 2020).

O PCV2 tem sido associado a várias doenças respiratórias em suínos, incluindo pneumonia intersticial, broncopneumonia, pneumonia necrotizante e pneumonia granulomatosa (SEGALÉS, 2012). A infecção por PCV2 pode agravar outras infecções respiratórias em suínos, como a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*, além disso, a coinfeção de PCV2 com outros vírus respiratórios, como o Vírus da *Influenza Suína* (SIV), pode levar a uma piora dos sintomas e a um aumento da mortalidade em suínos (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

A PNDS caracteriza-se por apresentar lesões cutâneas e nefrite intersticial em suínos de diversas idades. A PDNS é distinta, com máculas e pápulas vermelhas a escuras bem delimitadas (PALINSKI et al., 2017). Os rins costumam estar aumentados e pálidos e apresentam petéquias corticais. Histologicamente, o PDNS é caracterizado por vasculite necrosante sistêmica, juntamente com glomerulite e nefrite intersticial (DROLET et al., 1999).

1.4 Diagnóstico e Controle de PCV2

É importante associar os sinais clínicos com a presença do agente e lesões características. A utilização da Imunohistoquímica para diagnóstico da SMDS e também em falhas reprodutivas foi muito utilizada (HANSEN et al., 2010). Quanto à infecção sistêmica, OPRIESSNIG et al., 2006 sugerem que é necessário que o antígeno de PCV2 seja demonstrado em mais de um tecido linfóide analisado (linfonodo, baço e tonsila, por exemplo).

Tendo em vista que as vacinas atualmente são baseadas nos genótipos "a" e "b" do PCV2, estas conferem um certo grau de proteção heteróloga contra os novos genótipos existentes. Porém a utilização de vacinas homólogas oferece uma melhor proteção frente as infecções de PCV2. Todavia, além da monitoria da eficácia das vacinas, pode-se considerar a atualização das vacinas para os genótipos circulantes em cada região ou país quando as perdas são significativas (CIACCIZANELLA, 2017).

O controle do PCV2 nas granjas de suínos envolve uma combinação de medidas de biossegurança, vacinação, manejo e monitoramento regular do status sorológico e genotípico do rebanho. A implementação de um programa efetivo de controle do PCV2 pode ajudar a reduzir a disseminação da doença e minimizar seu impacto na suinocultura.

1.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Segundo, (TYRRELL, 1997) a PCR consiste na detecção e amplificação in vitro de regiões específicas de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA). Devido a sua sensibilidade e especificidade, simplicidade de montagem da reação e fácil execução, a PCR, vem sendo utilizada em várias aplicações nos últimos anos, tanto para a detecção de patógenos causadores de doenças, identificação de genes, doenças hereditárias e em pesquisas forenses.

O principal objetivo da realização da PCR é multiplicar um segmento do DNA ou cDNA (no caso de vírus RNA), buscando o diagnóstico, mesmo com baixas quantidades de DNA nas amostras. Tal multiplicação depende de alguns componentes como DNA, Primers, DNTP's, Taq polymerase e, também, um termociclador que divide a reação de PCR em três etapas básicas (desnaturação, anelamento e extensão) (SANTOS; STERNBERG; ALMEIDA, 2014) conforme demonstrado na figura 3.

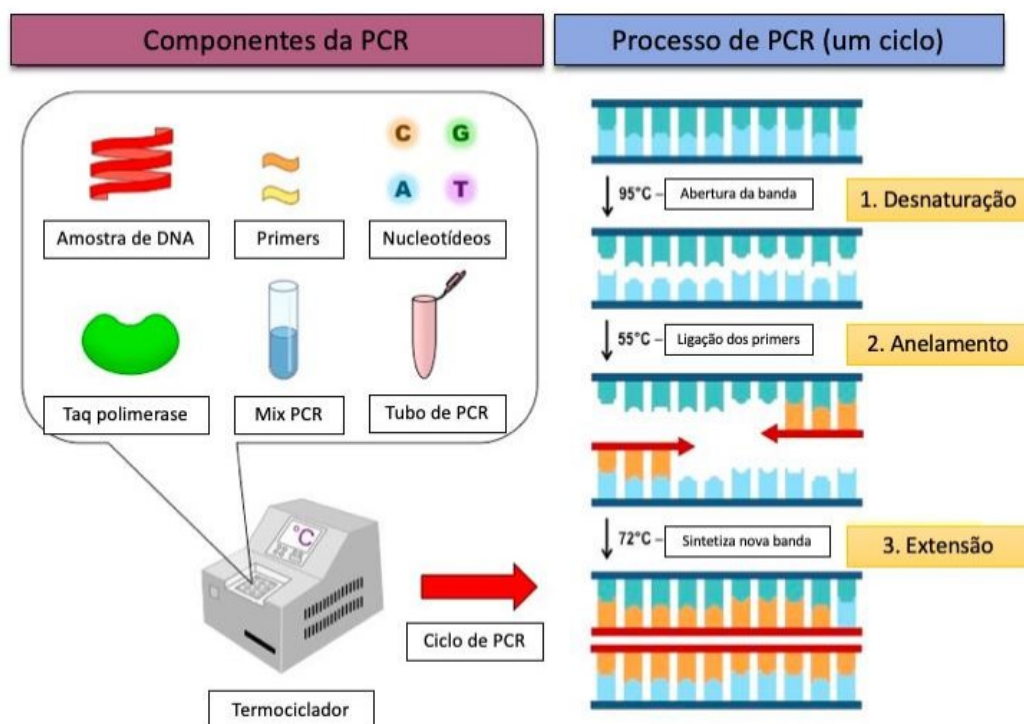


Figura 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os componentes necessários e etapas. Fonte: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr>

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar genotipicamente as atuais infecções por circovírus suíno.

2.2 Específicos

- Padronizar o teste de PCR para os três genótipos mais prevalentes de PCV2 n(PCV2a, PCV2b e PCV2d) que seja barato e de fácil acesso;
- Caracterizar a presença de PCV2b e PCV2d nas amostras clínicas de campo estudadas;
- Verificar a presença de coinfeções entre os genótipos de PCV2 e qual genótipo está mais presente em co infecções com PCV3.

3 DETECÇÃO DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNOS

Rovian Miotto^{1,3}; Caroline Pissetti²; Luis Carlos Bordin³; Janice Ciacci Zanella³

1. Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal. Instituto Federal Catarinense (IFC);
2. Centro do Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA);
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) suínos e aves.

3.1 Introdução

Os circovírus são os menores vírus de DNA fita simples de replicação autônoma, não envelopados e com simetria circular (MANKERTZ et al., 1997). Este vírus pertence à família Circoviridae, gênero Circovírus (ALLAN et al., 1995). Até o momento foram identificados quatro tipos de circovírus suínos (PCV) capazes de infectar suínos, que são os: PCV1, PCV2 e os mais recentes descobertos PCV3 e PCV4 (ZHAI et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

O genoma do PCV2 possui de 1767 a 1768 nucleotídeos, contém duas ORFs principais, localizadas em fitas opostas, ORF-1 e ORF-2, nas quais codificam proteínas relacionadas à replicação e do capsídeo, respectivamente (FINSTERBUSCH et al., 2005). Pela alta variabilidade genômica identificada nos isolados de PCV2, este foi dividido em genótipos baseados na ORF-2 ou em sequências do seu genoma completo (FRANZO et al., 2016). Atualmente o PCV2 é classificado em nove genótipos: PCV2a a PCV2i (BAO et al., 2018; FRANZO; SEGALÉS, 2018; LV et al., 2020; RAJKHOWA et al., 2021; WANG et al., 2020)

A vacinação, e a utilização de medidas de controle dos fatores de risco visando reduzir a disseminação e severidade da doença, são as ações mais eficientes para controlar a circovirose na espécie suína (SEGALÉS, 2015). Há diversas vacinas comerciais disponíveis atualmente, a maioria baseada no genótipo “a” (PCV2a) do circovírus suíno (ZANELLA; MORÉS; DE BARCELLOS, 2016). Todavia, com o aumento da diversidade dos

genótipos circulantes, se questiona a necessidade do desenvolvimento de vacinas mais eficazes, com atualizações e/ou inclusão de genótipos nas vacinas (OUYANG et al., 2018).

O PCV2 tem sido descrito como um dos principais patógenos virais que acometem suínos e causam perdas significativas à suinocultura mundial, desde sua descoberta (KARUPPANNAN; OPRIESSNIG, 2017). Já as espécies mais recentes descobertas como PCV3 e PCV4 (este último restrito em alguns países da Ásia), alertam o setor para um possível aumento na distribuição mundial, ou um agravamento da circovirose devido a coinfeção com o PCV2. Contudo, são necessários mais estudos com respeito a epidemiologia, patogênese, variantes genotípicos, imunogenicidade, coinfeções, dentre outros aspectos relacionados com estes novos PCVs (OPRIESSNIG et al., 2020).

As perdas causadas por infecções de PCV2 na suinocultura podem variar dependendo do grau de infecção e das condições de produção. No entanto, estudos indicam que essas perdas podem ser significativas em termos financeiros. Um estudo realizado em 2016 por SCHUENEMANN et al., estimaram que a infecção por PCV2 pode causar perdas econômicas de até 2,45 dólares por porco abatido nos Estados Unidos, já outro estudo realizado na União Europeia por GREENHALGH et al., 2017 mostram que o PCV2 pode causar perdas de até 5,5 euros por porco abatido, além de gastos com medicamentos para tratamento dos animais.

Tendo em vista os danos causados pelo PCV2 para a produção de suínos e o impacto econômico causado, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os genótipos de PCV2, buscando padronizar o teste convencional de PCR para três dos nove genótipos circulantes atualmente; estimar a presença de PCV2a, PCV2b e PCV2d a campo; a presença de coinfeções entre os genótipos e qual genótipo estava mais presente em coinfeções com PCV3, sendo uma medida de diagnóstico rápida e eficaz apresentando um baixo custo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Comitê de Ética

O estudo não envolveu nenhuma amostra humana, e todas as amostras usadas eram suínas e provenientes de diagnóstico do laboratório do Centro de Diagnóstico de Saúde Animal (CEDISA). Assim, o estudo não necessitou ser apresentado a comitês de ética.

3.2.2 Obtenção das amostras

Amostras de casos clínicos e com diagnóstico positivo para PCV2 e PCV3 foram obtidas através do Centro de Diagnóstico de Saúde Animal (CEDISA) em Concórdia, SC através de convênio técnico-científico com a Embrapa Suínos e Aves. Um total de 333 amostra de diagnóstico foram analisadas neste estudo.

As amostras incluíam um total de 105 amostras de soro, 10 de útero, 4 de suabes de reto, 3 de rim, 50 de pulmão, 6 de linfonodo, 31 de intestino, 61 de fetos (natimortos, mumificados), 2 de cérebro e 58 de pool de órgãos (fígado, rim, pulmão, baço, linfonodos, coração).

No CEDISA, visando a Identificação de PCV2 nas amostras, estas foram submetidas a um pré-tratamento com ATL (*Qiagen*) e proteinase K, a 56°C com agitação, overnight, sendo amostras dos mais diferentes órgãos que foram coletadas de acordo com a suspeita clínica. O DNA viral foi extraído usando um kit comercial (*IndiMag Pathogen Kit, Indical Bioscience*) em extração automatizada por *IndiMag 48s (Indical Bioscience)*, visando a identificação de PCV2 através de uma PCR quantitativa (*qPCR*).

A reação de *qPCR* para diagnóstico de PCV2 foi realizada visando a amplificação de uma região do gene Cap utilizando-se os primers PCV2_F (5'-CCAGGAGGGGCGTTGTGACT-3') e PCV2_R (5'-CGCTACCGTTGGAGAAGGAA-3') e a sonda PCV2_S (5'-AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT-3') conforme previamente descrito (OLVERA et al., 2004). Para a execução da *qPCR*, 2,5 µL de DNA extraído foram adicionados a uma mistura GoTaq® Probe *qPCR* master mix (Promega),

1,25 μM e 0,5 μM de primer específico e sonda, respectivamente. O sinal de fluorescência foi realizado ao final de cada fase de extensão do ciclo, no termociclador QuantStudio™ Flex 6 (*Applied Biosystems*). Todas as amostras com $C_t < 38,00$ foram consideradas positivas.

As amostras são representativas dos anos de 2021 e 2022, sendo 65 e 268 amostras, respectivamente. As amostras analisadas são de suínos de idades diversas (desde suínos de reposição até animais na fase determinação), e das mais diferentes localidades do Brasil, sendo principalmente dos estados do Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (267/333), e demais estados como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, também de importância para a produção de carne suína.

3.2.3 Controles Positivos

Com o objetivo de se obter os controles positivos da reação, 20 amostras foram escolhidas aleatoriamente e submetidas a reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada com primers descritos anteriormente por Dupont et al., 2008, buscando amplificar a região da ORF-2 do vírus. Com isso, foi possível obter controles para os genótipos de PCV2b e PCV2d. Já para o PCV2a, foi utilizado uma amostra de referência, presente no banco da Embrapa, no qual esta, havia sido sequenciada previamente por GAVA et al., 2018. Após isso, as amostras sequenciadas foram testadas com o objetivo de validar o teste de PCR, resultado do teste dos controles está exemplificado na figura 4.

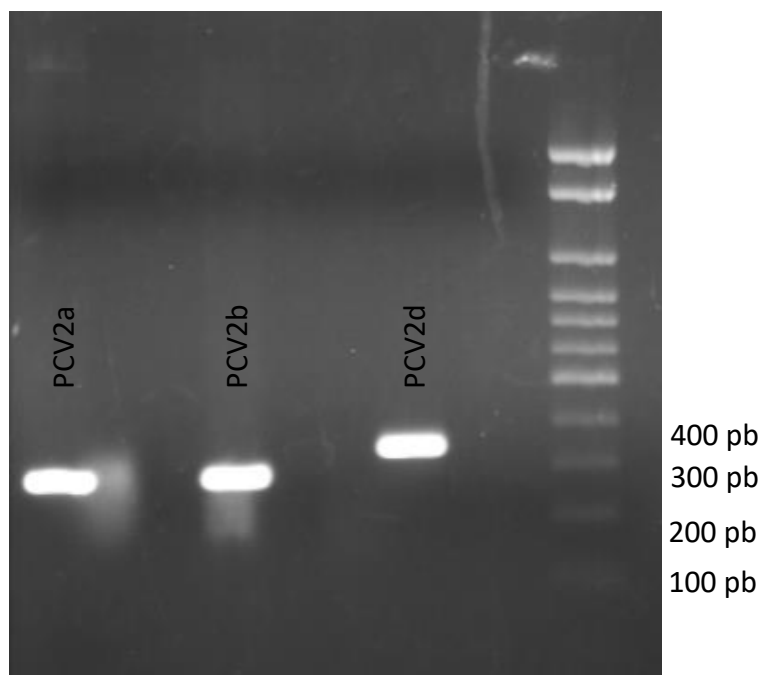


Figura 4. Controles positivos de cada genótipo. PCV2a (277pb); PCV2b (277pb) e PCV2d (343pb) usando marcador de 100pb.

3.2.4 Reação de PCR para genotipagem

Cada amostra foi testada individualmente para cada um dos três genótipos de PCV2 de interesse. A PCR foi baseada na ORF-2 do circovírus que é a região que apresenta maiores taxas de diversidade. As sequências de primers utilizados, estão demonstradas na figura 5. Os *primers* foram diluídos a 10 pmol, e a reação usou 2,5 ul de Buffer, 1 µl com 25mmol de MgCl₂, 1 µl de dntp, 0.6 µl de cada primer e ainda 2µl de DNA de cada amostra, porém, não foi realizada a quantificação dos DNAs.

As condições de PCR utilizadas foram de: pré-desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos, conforme descrito por KIM et al., 2018. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados em luz UV após coloração de Brometo de Etídio a 2%.

Atualmente há diversos testes no mercado capazes de realizar a genotipagem de PCV2, tendo em vista isso, foi possível realizar a avaliação da concordância do nosso teste de PCR frente a um *kit* comercial de *qPCR* (*Kytl® PCV-2 Typing kit*) em relação a sensibilidade do teste e especificidade quanto a genotipagem do PCV2.

Nome do primer	Sequência de nucleotídeo (5'- 3')	Tamanho do produto	Referência
PCV2ab - F	GGT TGG AAG TAA TCA ATA GTG GA	277pb	KWON et al., 2017
PCV2a - R	GGG GAA CCA ACA AAA TCT C		KIM et al., 2018
PCV2ab - F	GGT TGG AAG TAA TCA ATA GTG GA	277pb	KWON et al., 2017
PCV2b - R	GGG GCT CAA ACC CCC GCT C		HESSE; KERRIGAN; ROWLAND, 2008
PCV2d - F	GGT TGG AAG TAA TCG ATT GTC CT	343 pb	KWON et al., 2017
PCV2d - R	TCA GAA CGC CCT CCT GGA AT		

Figura 5. Primers utilizados no estudo de genotipagem

3.3 Resultados

Das 333 amostras analisadas, foi detectada a presença de PCV2a, PCV2b ou PCV2d em 266 amostras testadas. Em 67 amostras não foi possível realizar a genotipagem, conforme apresentado na figura 6. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a qualidade do DNA. Todavia, não foi possível reextrair o DNA, devido às amostras originais terem sido descartadas. De todas as amostras genotipadas, nenhuma foi positiva para PCV2a. Já 151 foram positivas para PCV2b, 88 foram positivas para PCV2d e 27 amostras apresentaram coinfeção entre os dois genótipos (PCV2b e PCV2d), conforme demonstrado na figura 7.

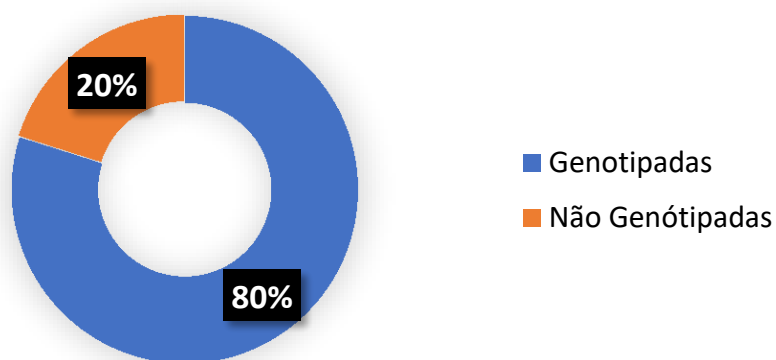


Figura 6. Porcentagem de amostras que foram passíveis de genotipagem e amostras que não foi possível encontrar genótipos.

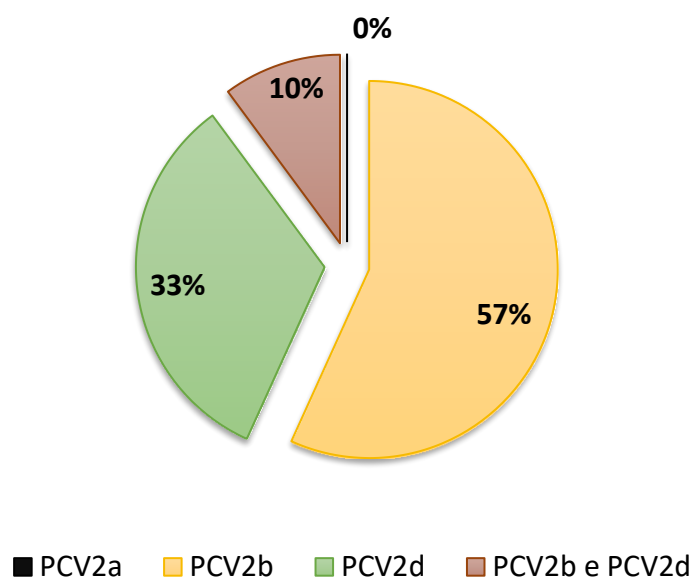


Figura 7. Porcentagem de amostras positivas para cada genótipo e que apresentaram coinfeção.

Nas mais diferentes amostras recebidas, o PCV2b foi detectado mais frequentemente em amostras de cérebro (2/2), linfonodos (6/6), fezes (3/3) e útero (3/3). Já para PCV2d, as amostras de soro foram as mais frequentemente positivas, apresentando 43 amostras positivas para este genótipo em 81 positivas no total,

conforme demonstrado na Figura 8. Assim, observa-se que o PCV2b está distribuído em todos os tipos de amostras recebidas. As amostras de suabe retal, foram as que mais apresentaram coinfeção entre o genótipo de PCV2b e PCV2d.

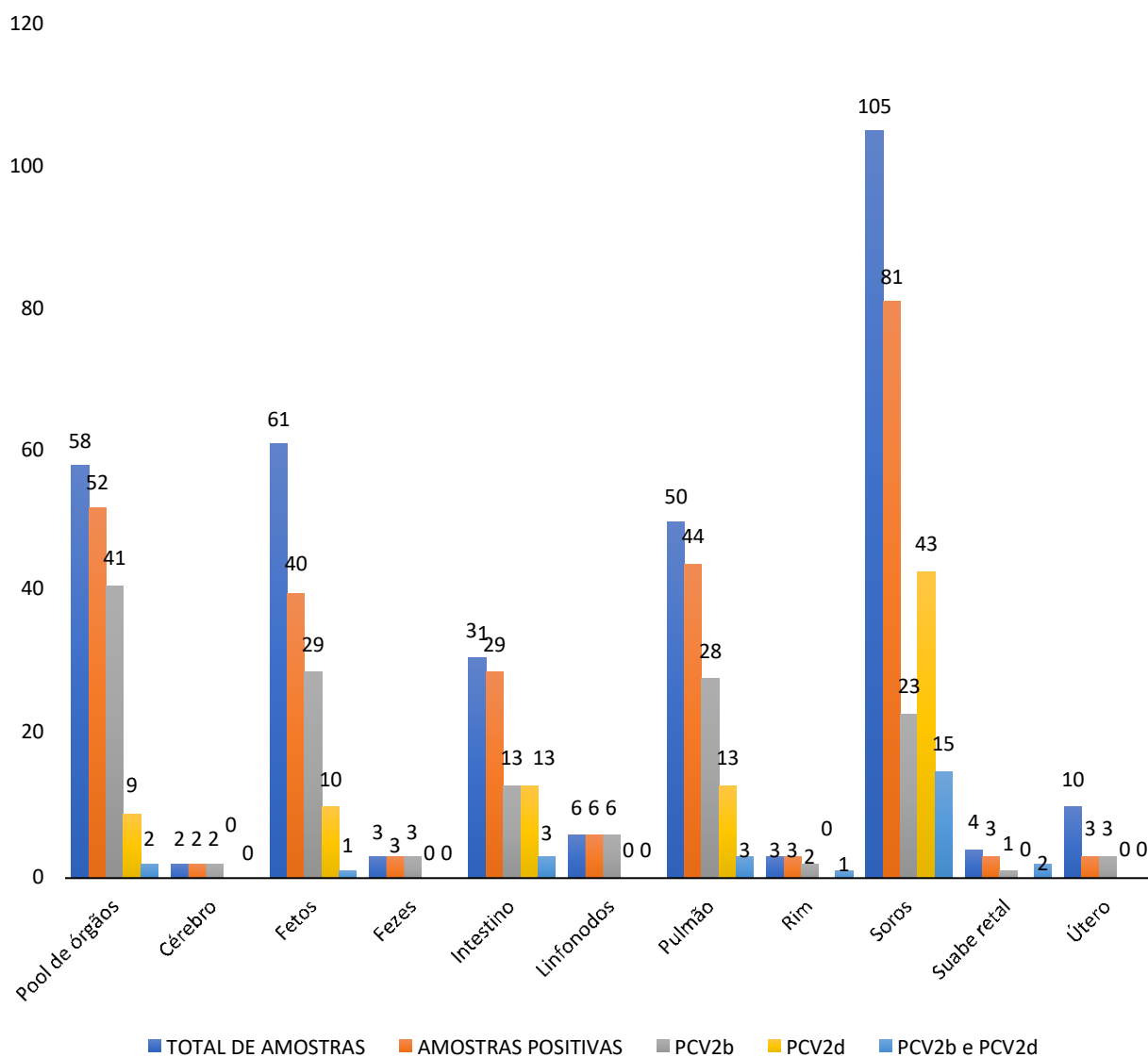


Figura 8. Amostras recebidas e positivas por cada tipo de amostra e cada genótipo mais prevalente em cada amostras.

O estado que mais apresentou positividade, foi o estado do Mato Grosso do Sul, sendo que em 100% das amostras foi possível realizar a genotipagem, conforme Figura 9. Conforme mencionado acima, a maior parte das amostras foram recebidas dos três

estados do Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), que representam a maior produção de suínos do País. Com relação a distribuição de genótipo por estado, o PCV2b foi mais frequentemente detectado em amostras do estado do Paraná (61,99%), o PCV2d no estado de São Paulo, mas no Mato Grosso do Sul foi onde se apresentou as maiores taxas de coinfeção entre os dois genótipos encontrados.

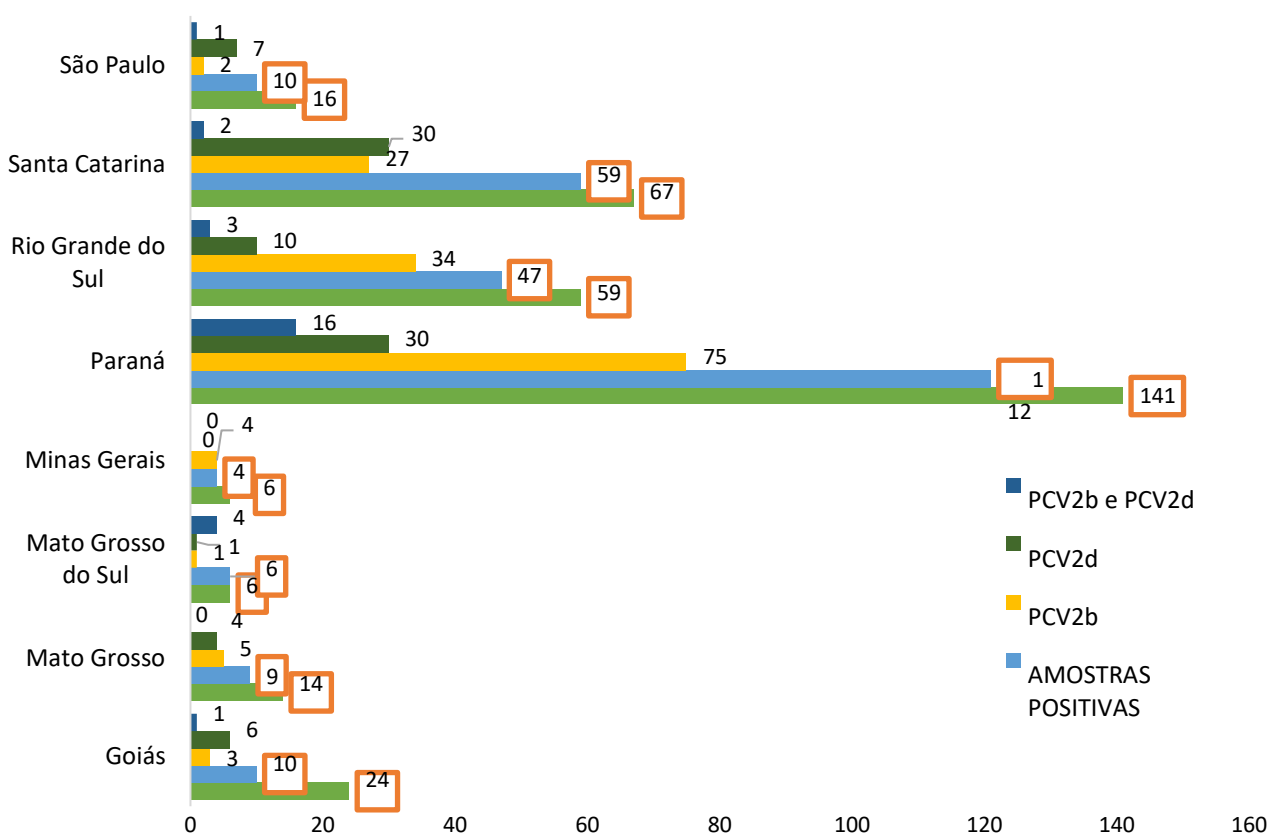


Figura 9. Amostras recebidas por cada Estado Brasileiro, demonstrando a positividade de das amostras e também genótipo mais presente em cada uma delas

Quanto à fase produtiva, a maior quantidade de amostras genotipadas foi na fase de Terminação, na qual PCV2d foi o genótipo mais detectado em 62 amostras, enquanto o PCV2b foi detectado em 41 amostras. Já na fase de creche o genótipo mais prevalente foi o PCV2b, estando presente em 51 amostras, sendo o PCV2d detectado em 11 amostras. As maiores taxas de coinfeção de PCV2b e PCV2d foram encontradas em

amostras da terminação, um total de 20 amostras. As maiores taxas de PCV2b foram encontradas nas amostras que não foram informadas em que fase de produção eram provenientes e o PCV2d esteve mais presente nas amostras de matrizes, conforme mostrado na figura 10.

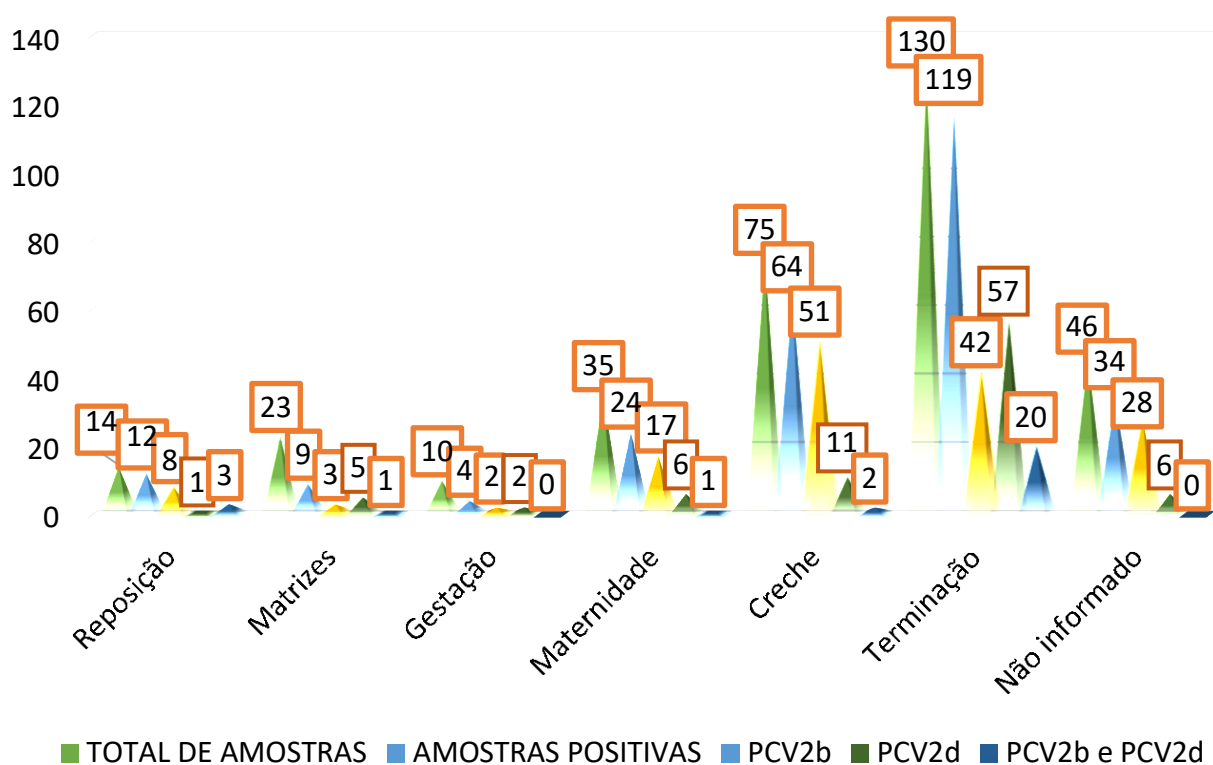


Figura 10. Gráfico apresentando as diferentes fases de produção, com os genótipos mais positivos e o total de amostras positivas.

3.3.1 Coinfecções

Quanto a coinfecções, 27 amostras apresentaram coinfecção dos genótipos de PCV2b e PCV2d. Contudo, nenhuma outra coinfecção entre genótipos de PCV2 foi encontrada e a maior parte das coinfecções foram encontradas em amostras obtidas de suabes, representando 66,67% das amostras positivas.

Quanto às coinfecções com PCV3, 26 amostras apresentaram-se positivas para PCV2 e PCV3. As amostras oriundas de fetos foram as que mais apresentaram positividade de coinfecção entre os genótipos. Além disso, foi possível observar uma

maior presença de amostras do genótipo "b" nestas coinfeções, ou seja, 20 amostras positivas para PCV2b e 5 amostras positivas para PCV2d. Apenas uma amostra apresentou positividade para coinfeção de PCV2b, PCV2d e PCV3.

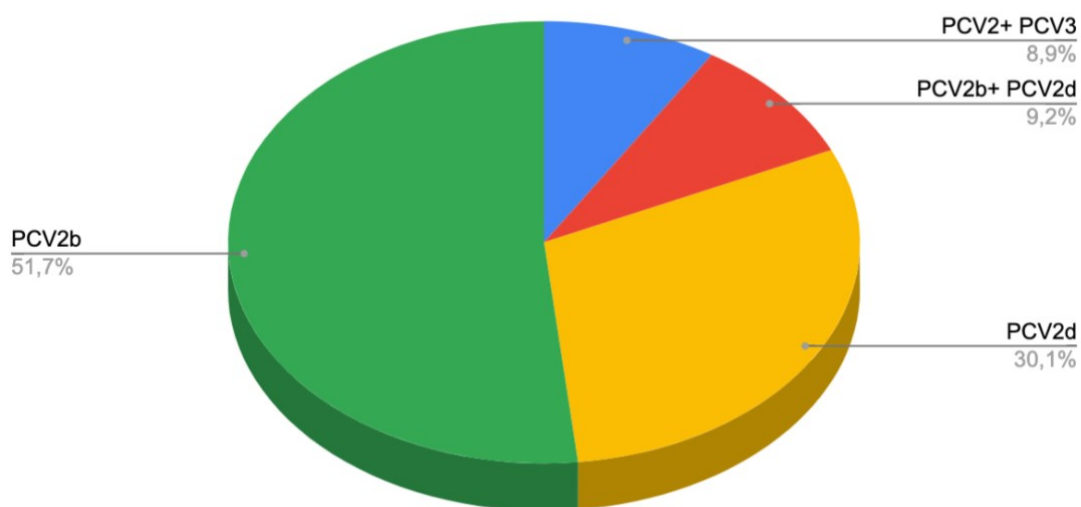


Figura 11. Gráfico apresentando as porcentagens de amostras com coinfeção entre os genótipos de PCV2 e a coinfeção entre PCV2 e PCV3.

3.3.2 Avaliação da concordância entre os dois testes

Um total de 18 amostras foram testadas primeiramente com o *kit* comercial (*Kylt*[®] *PCV-2 Typing kit*) e, posteriormente, na PCR convencional padronizada aqui (Figura 12). Os resultados de ambas as análises mostraram que grande parte das amostras apresentou coinfeção entre os genótipos.

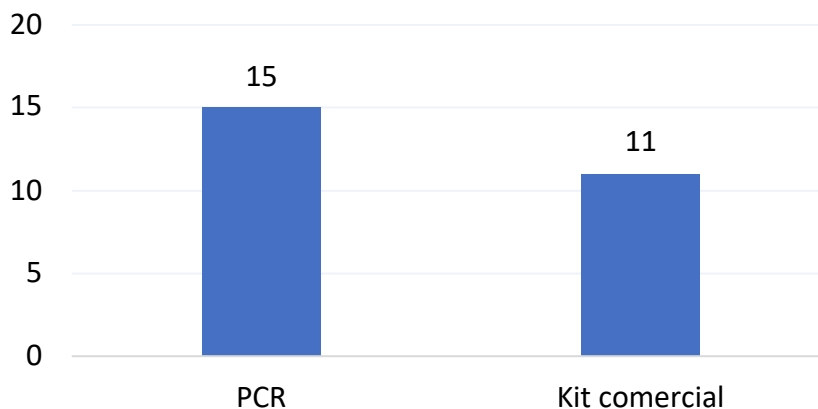


Figura 12. Amostras genotipadas em cada um dos dois testes avaliados.

Os resultados foram submetidos ao teste de Kappa, com o objetivo de avaliar a concordância entre os testes e os resultados do teste estão exemplificados na Figura 13.

Amostras	<i>Kappa</i>	Acurácia
PCV2b	0.478 (0.094 – 0.863)	77,8
PCV2d	0.658 (0.308 – 1.000)	83,33

Figura 13. Teste estatístico de Kappa, e acurácia entre as genotipagens.

O teste de PCR utilizado neste trabalho foi mais sensível para algumas amostras, sendo assim, 4 amostras foram genotipadas, conforme mostrado na análise estatística, enquanto no kit comercial não foi possível caracterizar os genótipos nas amostras analisadas. Em apenas uma amostra (amostra 2) houve discrepância entre o Kit comercial e o PCR padronizado aqui, onde o kit comercial identificou uma coinfeção (PCV2b e PCV2d) e no teste de PCR foi encontrado apenas PCV2b.

Foi possível analisar os dados entre os genótipos e os dois testes. Como pode ser observado o teste de PCV2b e o PCV2 geral (PCR convencional e o Kit) apresentaram a

mesma acurácia (77,8). Já no teste de PCV2d, a acurácia nos testes foi maior, sendo de 83,33. O teste de Kappa apresentou um intervalo de confiança maior que 0.

Assim, estes resultados demonstram que os dois testes são capazes de realizar a identificação dos genótipos e também apresentam concordância entre eles, porém, a maior concordância foi encontrada na identificação do PCV2d, por ter apresentado uma acurácia e um intervalo de confiança maior.

3.4 Discussão

Em nosso estudo, 266 de 333 amostras, representando 79,88% das amostras, foram genotipadas para PCV2. Estes resultados corroboram com diversos estudos no mundo, onde demonstram que os PCV2b e PCV2d são atualmente os genótipos mais prevalentes (HAN et al., 2021; HE et al., 2022; LIN et al., 2014; MONE et al., 2020; YAO et al., 2019; ZHENG et al., 2020). Outras pesquisas mostram a importância do PCV2b e PCV2d em sua disseminação global nos anos recentes, sendo predominantes nas produções de suínos mundiais. Nosso estudo mostra que os genótipos de PCV2b e PCV2d foram encontrados em todos os estados das amostras analisadas, o que se assemelha com um estudo conduzido por XU et al., 2022 onde esses dois genótipos foram encontrados em todas as províncias da China analisadas.

Curiosamente, o PCV2a não foi encontrado em nenhuma amostra clínica, o que também foi relatado por EDDICKS et al., 2017. Sugere-se que isso se deve ao impacto da utilização das vacinas para PCV2 (uma vez que a maioria das vacinas utilizadas são baseadas no genótipo de PCV2a) e na pressão de vacinação (FRANZO et al., 2016; SALGADO et al., 2014; SILVA; CASTRO, 2022), favorecendo assim o aparecimento e seleção de novos genótipos, principalmente o PCV2b e PCV2d (EDDICKS et al., 2017; WEISSENBACHER-LANG et al., 2020).

Estudos prévios mostram a mudança de genótipos mais prevalentes na produção de suínos com o passar dos anos (XIAO; HALBUR; OPRIESSNIG, 2015) passando do genótipo PCV2a para o PCV2b a partir de 2002 (BEACH; MENG, 2012; PATTERSON;

OPRIESSNIG, 2010) e, em 2012, a mudança aconteceu do genótipo de PCV2b para o PCV2d (KWON et al., 2017a; MA et al., 2021). Desde então, o PCV2d se tornou o mais prevalente em diversas regiões do mundo, como na China (WANG et al., 2020b; ZHENG et al., 2020) Coréia do Sul (JANG et al., 2021), Áustria (WEISSENBACHER-LANG et al., 2020), Estados Unidos (WANG et al., 2020); Colômbia (VARGAS-BERMUDEZ; MOGOLLÓN; JAIME, 2022) e na República Dominicana (GAINOR et al., 2022).

A infecção pelo PCV2 causa um impacto significativo para a cadeia suinícola, levando a diversos prejuízos para os produtores, sendo de suma importância a doença subclínica (OPRIESSNIG et al., 2006). Este estudo demonstrou que o PCV2b foi o mais prevalente sendo detectado em 151 das 266 amostras analisadas, o que corrobora com os resultados de várias pesquisas. Dentre elas, uma pesquisa realizada na Austrália em que este vírus foi detectado em 7 amostras de 17 analisadas (MONE et al., 2020), em outro estudo realizado na Áustria em 2020, por WEISSENBACHER-LANG et al., foi demonstrada uma maior prevalência de PCV2b em um relato retrospectivo, de 2002 a 2017, em que o PCV2b foi encontrado em todos os anos estudados, também com o estudo retrospectivo dos anos 2015 até 2018 de ZHENG et al., 2020 na China.

A presença de coinfeções entre os genótipos (PCV2b e PCV2d), vem se tornando cada vez mais frequente, fato este que foi observado aqui em 27 amostras, o que corrobora com dados previamente publicados por RUDOVA et al., 2022 no qual, foi possível observar coinfeções entre os genótipos PCV2b e PCV2d em amostras de suídeos selvagens e em suínos domésticos na Ucrânia e com os resultados de KIM et al., (2018), que encontraram coinfeção entre os genótipos de PCV2b e PCV2d em 3 amostras de 30 analisadas.

Foi possível observar também coinfeção com o PCV3 em nosso estudo, em um total de 26 amostras. Novamente este resultado se relaciona com outros estudos pelo mundo, que no qual também foi possível identificar coinfeção entre os genótipos de PCV2 e PCV3 (KIM et al., 2018; XU et al., 2022; YANG YANTING et al., 2022). Porém,

nenhum deles relaciona qual genótipo de PCV2 foi o mais prevalente em coinfeções com o PCV3.

As amostras de linfonodos, fornecem um bom indicativo de como está a infecção por PCV2 nas granjas (PARK; CHAE, 2021). Em nosso estudo, de todas as amostras de linfonodo recebidas, foram possíveis de realizar a genotipagem. Além da realização do diagnóstico cuidadoso no momento da avaliação dos animais, a utilização de amostras de qualidade é de suma importância. O PCV2b foi detectado em todos os tipos de amostras recebidas, o que sugere que este genótipo cause uma infecção sistêmica nos animais, conforme dados publicados em diversos trabalhos (ALLAN; KRAKOWKA; ELLIS, 2002; CARMAN et al., 2008; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Já o PCV2d foi detectado apenas em amostras de órgãos, pulmão, fetos, intestino e soro sanguíneo.

Um importante dado observado neste estudo, foi a identificação de PCV2b em amostras de cérebro de suínos em fase de terminação. ROSELL et al., 1999 observa que as lesões cerebrais causadas por PCV2 são ocasionais. Em nosso estudo, por não termos tido acesso ao histórico clínico destes animais, não foi possível correlacionar a sintomatologia clínica apresentada pelos animais ao genótipo do PCV2 detectado.

O PCV2d foi o genótipo mais encontrado na fase de terminação, totalizando 57 amostras positivas. Este resultado corrobora com um estudo realizado na Coreia do Sul, no qual PARK; CHAE, 2021 encontraram uma maior prevalência de PCV2d em linfonodos de suínos ao abate. Por outro lado, na fase de creche o PCV2b foi o genótipo mais encontrado, um total de 51 amostras. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que encontra esses dados e busca uma correlação entre genótipo e fase de produção.

A terminação foi a fase em que mais se obteve amostras positivas para PCV2 e que puderam ser genotipadas. Provavelmente isso se deva a queda na imunidade vacinal e imunidade materna, assim, os suínos ficam mais susceptíveis às infecções por PCV2 (PARK; CHAE, 2021).

Quanto à avaliação da concordância dos testes de genotipagem, o teste de PCR padronizado no presente trabalho foi mais eficaz por conseguir genotipar um número

maior de amostras quando comparado com o kit comercial, o que mostra que trata-se de uma PCR que pode ser satisfatoriamente utilizada na genotipagem de PCV2.

3.5 Conclusão

Com a realização deste trabalho podemos concluir que PCV2b continua muito presente nas granjas mas, também, foi possível observar o aumento da detecção de PCV2d nas amostras avaliadas. É importante observar a existência de coinfeções entre os genótipos, inclusive a co-infecção com o PCV3. Baseado nestes dados, deve-se atentar para a monitoria da eficácia das vacinas e do aparecimento de circovirose clínica. Desta forma, é importante estudar a evolução do PCV2 para diferentes genótipos e avaliar a atualização das vacinas existentes no mercado, tendo em vista a alta taxa de mutação apresentada pelo vírus. O controle da circovirose deve aliar o uso adequado de vacinas com medidas de biossegurança e manejo sanitário, buscando assim a melhora na saúde dos suínos. Podemos observar também que o teste de PCR padronizado aqui é eficaz quando comparado com um kit comercial para genotipagem de PCV2, o que torna uma alternativa de menor custo para o rápido diagnóstico dos três principais genótipos circulantes de PCV2 atualmente.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais podemos observar que o PCV2b se mantém muito prevalente na produção de suínos no Brasil, porém, interessante, não foi possível detectar o genótipo de PCV2a circulando nos rebanhos suínos brasileiros, possivelmente devido a ampla utilização de vacinas e muitas delas baseadas no PCV2a. Foi possível padronizar um teste de genotipagem através de uma PCR convencional para as amostras de PCV2. Além disso, foram encontrados dados importantes a respeito da presença de coinfeções entre os genótipos analisados e com amostras de PCV3. O teste de PCR padronizado foi eficaz no diagnóstico de PCV2 e mais sensível em genotipar algumas amostras analisadas, se tornando um recurso valioso para a genotipagem e apresentando uma alta especificidade, sendo também de menor custo.

5 REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Veterinary Microbiology**. v.44 p.49-64, 1995.
- ALLAN, G. M. et al. Experimental Reproduction of Severe Wasting Disease by Co-infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus. **J. Comp. Path.** v.121. p1-11, 1999.
- ALLAN, G. M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **J Vet Diagn Invest**. v.10 p.3-10 1998.
- ALLAN, G.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. PCV2: ticking time bomb. **Pig Program**. v. 18, mar. 2002.
- BAO, F. et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 432–440, 1 abr. 2018.
- BEACH, N. M.; MENG, X.J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, n. 1–2, p. 33–42, 1 mar. 2012.
- CARMAN, S. et al. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease–2004-2006. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 72, n. 3, p. 259–268, abr. 2008.
- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 326–336, 1 maio 2005.
- CHEN, N. et al. Co-infection status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) in eight regions of China from 2016 to 2018. **Infection, Genetics, and Evolution**, v. 68, p. 127–135, 1 mar. 2019.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. SITUAÇÃO ATUAL DA CIRCOVIROSE NO BRASIL. 2017.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; et al. Novos conhecimentos sobre a infecção por PCV2 e a emergência de novas estirpes virais. *Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos*. D. E. B. F. P. B. I. W. M. L. Bernardi. Porto Alegre, UFRGS Gráfica. V.1: p207-220. 2015.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus

type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 55(5), p. 522–527, out. 2003.

DEZEN, D. Amplificação do genoma de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) por círculo rolante e produção de um clone viral. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DROLET R, THIBAUT S, D'ALLAIRE S, THOMSON J, DONE S. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. **Swine Health Prod** 7:283–285, 1999.

DUPONT, K. et al. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1–2, p. 56–64, 1 abr. 2008.

EDDICKS, M. et al. Vorkommen von genotypen des porzinen circovirus typ 2 (PCV2) in schweinebeständen mit unterschied lichen impfstrategien gegen PCV2. **Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere**, v. 45, n. 2, p. 90–97, 2017.

FINSTERBUSCH, T. et al. Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. **Virology**, v. 343, n. 1, p. 36–46, 5 dez. 2005.

FIRTH, C. et al. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12813–12821, 15 dez. 2009.

FRANZO ID, G.; SEGALÉS, J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. **Plos one**, 2018.

FRANZO, G. et al. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 1–2, p. 158–162, 9 jul. 2015.

FRANZO, G. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. **Scientific Reports**, v. 6, 19 dez. 2016.

GAINOR, K. et al. Detection and Complete Genome Analysis of Porcine Circovirus 2 (PCV2) and an Unclassified CRESS DNA Virus from Diarrheic Pigs in the Dominican Republic: First Evidence for Predominance of PCV2 from the Caribbean Region. **Viruses**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2022.

GAVA, D. et al. Structure analysis of capsid protein of Porcine circovirus type 2 from pigs with systemic disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 351–357, 1 abr. 2018.

GREENHALGH, Paul et al. Estimating the economic impact of porcine circovirus type 2 (PCV2) on the European pig meat sector. **Veterinary Microbiology**, v. 211, p. 114-123, 2017.

GUO, Z. et al. Co-infection status of porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs with watery diarrhea in Henan province, central China: Co-infection of PCV2, PCV3 and PEDV. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 1 maio 2020.

HAN, L. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in Hebei Province from 2016 to 2019: a retrospective study. **Archives of Virology**, v. 166, n. 8, p. 2159–2171, 1 ago. 2021.

HANSEN, M. S. et al. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1–2, p. 203–209, 29 jul. 2010.

HARMON, K. M. et al. Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, 2015.

HE, W. T. et al. Virome characterization of game animals in China reveals a spectrum of emerging pathogens. **Cell**, v. 185, n. 7, p. 1117- 1129.e8, 31 mar. 2022.

HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R. R. R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. **Virus Research**, v. 132, n. 1–2, p. 201–207, mar. 2008.

JANG, G. et al. Genetic and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 on Jeju Island, South Korea, 2019–2020: evidence of a novel intergenotypic recombinant. **Archives of Virology**, v. 166, n. 4, p. 1093–1102, 1 abr. 2021.

KARUPPANNAN, A. K.; OPRIESSNIG, T. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. **Viruses**. 1 maio 2017.

KIM, S. C. et al. The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 2018.

KLAUMANN, F. et al. Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. **Frontiers in Veterinary Science** Frontiers Media S.A., , 12 dez. 2018.

KWON, T. et al. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. **Virus Research**, v. 228, p. 24–29, 15 jan. 2017.

LIN, H. XING et al. A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) co-infection. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 1–2, p. 198–205, 25 jun. 2014.

LIU, J. et al. Detection of PCV2e strains in Southeast China. **PeerJ**, v. 2018, n. 3, 2018.

LV, Q. et al. Genomic analysis of porcine circovirus type 2 from southern China. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 4, p. 875–889, 1 nov. 2020.

MA, Z. et al. Epidemiological investigation of porcine circovirus type 2 and its coinfection rate in Shandong province in China from 2015 to 2018. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2021.

MANKERTZ, A. et al. Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus. **Journal Of Virology**. v.71. n. 3. p.2562-2566, 1997.

MENG, X. J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Pathogenesis and interaction with the immune system. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 43–64, 2013.

MONE, N. K. et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Queensland, Australia. **Australian Veterinary Journal**. v.98. p.388-395.2020.

OLVERA, A. et al. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 117, n. 1, p. 75–80, abr. 2004.

OPRIESSNIG, T. et al. Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Dual Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. **Vet Pathol**. v.41. p.624-640. 2004.

OPRIESSNIG, T. et al. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 8, p. 923–929, ago. 2006.

OPRIESSNIG, T. et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus Research**, v. 286, 1 set. 2020.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.-J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.19 p.591-615. 2007.

OUYANG, T. et al. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. **Viruses**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

OUYANG, T. et al. Mouse models of porcine circovirus 2 infection. *Animal Models and Experimental Medicine* **John Wiley and Sons Inc.**, , 1 mar. 2018.

PALINSKI, R. et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *Journal of Virology*, v. 91, n. 1, jan. 2017.

PARK, K. H.; CHAE, C. The prevalence of porcine circovirus type 2e (PCV2e) in Korean slaughter pig lymph nodes when compared with other PCV2 genotypes. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 68, n. 6, p. 3043–3047, 1 nov. 2021.

PATTERSON, A. R.; OPRIESSNIG, T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Animal Health Research Reviews*, v. 11, n. 2, p. 217–234, 2010.

PHAN, T. G. et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal*, v. 13, n. 1, p. 1–8, 11 nov. 2016.

RAJKHOWA, T. K. et al. Emergence of porcine circovirus 2g (PCV2g) and evidence for recombination between genotypes 2g, 2b and 2d among field isolates from non-vaccinated pigs in Mizoram, India. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 90, p. 104775, 1 jun. 2021.

RITTERBUSCH, G. A. et al. Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. *Research in Veterinary Science*, v. 92, n. 3, p. 519–523, jun. 2012.

ROSELL, C. et al. Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural Cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. *Journal of Comparative Pathology*, v. 120, n. 1, p. 59–78, 1 jan. 1999.

RUDOVA, N. et al. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. *Viruses*. 2022.

S HARDING, J. C. et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health and Production*. v.6n.6p249-254. 1998. Disponível em: <<http://www.aasp.org/shap.html>>.

SALGADO, R. L. et al. Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. *Genome Announcements*, v. 2, n. 2, 2014.

SANTOS, E. A.; STERNBERG, C.; ALMEIDA, R. T. Influência Da Temperatura Ambiente Na Análise Do Termociclador. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB. 2014.

SCHUENEMANN, Gustavo M. et al. Economic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination in the United States swineherd. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016.

SEGALÉS, J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. **Expert Review of Vaccines** Expert Reviews Ltd., , 1 mar. 2015.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, mar. 2012.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**. Anais...Elsevier, 4 fev. 2004.

SHI, Jichao et al. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Infection Increases Susceptibility to Secondary Haemophilus parasuis Infection in Piglets. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 1-13, 2020..

SILVA, R. R. DA; CASTRO, A. M. M. G. DE. Porcine circovirus 2: Status atual e seus desafios. **Pubvet**, v. 16, n. 4, p. 1–14, abr. 2022.

SUN, W. et al. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 4 (PCV4) in Guangxi, China. **Gene**, v. 773, 20 mar. 2021.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl. Bakteriol. Orig.**, v. 266, p. 153–167, 1974.

TYRRELL, D. A. Polymerase chain reaction. **BMJ: British Medical Journal**, v. 314, n. 7073, 1997.

VAN- GIAP NGUYEN et al. Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2021

VARGAS-BERMUDEZ, D. S.; MOGOLLÓN, J. D.; JAIME, J. The Prevalence and Genetic Diversity of PCV3 and PCV2 in Colombia and PCV4 Survey during 2015–2016 and 2018–2019. **Pathogens**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2022.

WANG, D. et al. Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. 2022.

WANG, Y. et al. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 3, p. 1284–1294, 1 maio 2020.

WEISSENBACHER-LANG, C. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) genotyping in Austrian pigs in the years 2002 to 2017. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 15 jun. 2020.

XIAO, C. T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1830–1841, 1 jul. 2015.

XU, Q. et al. Epidemiology and Genetic Diversity of PCV2 Reveals That PCV2e Is an Emerging Genotype in Southern China: A Preliminary Study. **Viruses**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2022.

YANG YANTING et al. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) in the Southwest of China during 2020–2022. **Frontiers in Veterinary Science**, 24 November 2022.

YAO, J. et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains between 2002 and 2016 reveals PCV2 mutant predominating in porcine population in Guangxi, China. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 25 abr. 2019.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; DE BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 1 maio 2016.

ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. Memoria... Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2000.

ZHAI, S. L. et al. Reservoirs of Porcine Circoviruses: A Mini Review. **Frontiers in Veterinary Science** Frontiers Media S.A., 19 set. 2019.

ZHANG, Chengcheng et al. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) and Reproductive Disorders in Female Swine: A Review. **Frontiers in Veterinary Science**, [s.l.], v. 6, p. 1-12, 2019.

ZHANG, D. et al. Establishment of an SYBR Green-based real-time PCR assay for porcine circovirus type 4 detection. **Journal of Virological Methods**, v. 285, 1 nov. 2020.

ZHENG, G. et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) between 2015 and 2018 in Henan Province, China. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, 7 jan. 2020.