

SEBASTIÃO ANDRÉ BARBOSA JÚNIOR

**ESTUDO DO *CIRCOVÍRUS SUÍNO-2* (PCV2) PELAS TÉCNICAS DE
ELISA INDIRETO POR CAPTURA DE ANTICORPO E PCR EM
TEMPO REAL EM SUÍNOS**

Recife - PE

2016

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

SEBASTIÃO ANDRÉ BARBOSA JÚNIOR

**ESTUDO DO *CIRCOVÍRUS SUÍNO-2* (PCV2) PELAS TÉCNICAS DE
ELISA INDIRETO POR CAPTURA DE ANTICORPO E PCR EM
TEMPO REAL EM SUÍNOS**

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

Orientadora:
Profa. Dra. Clara Nilce Barbosa

Coorientador:
Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Recife - PE

2016

Ficha catalográfica

B238e Barbosa Júnior, Sebastião André
 Estudo do Circovírus suíno - 2 (PCV2) pelas técnicas de ELISA
 indireto por captura de anticorpo e PCR em tempo real em suínos /
 Sebastião André Barbosa Júnior. – Recife, 2016.
 50 f. : il.

 Orientadora: Clara Nilce Barbosa.

 Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
 Veterinária, Recife, 2016.

 Referências.

 1. Antígenos 2. Anticorpos 3. Diagnóstico 4. Suíno – Doenças
 5. Virologia veterinária I. Barbosa, Clara Nilce, orientadora
 II. Título

CDD 636.089

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

**ESTUDO DO *CIRCOVÍRUS SUÍNO-2* (PCV2) PELAS TÉCNICAS DE
ELISA INDIRETO POR CAPTURA DE ANTICORPO E PCR EM
TEMPO REAL EM SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado elaborada por
SEBASTIÃO ANDRÉ BARBOSA JÚNIOR

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Clara Nilce Barbosa
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Coorientador – Departamento de Genética da UFPE

Prof. Dr. Aderaldo Alexandrino de Freitas
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

A Deus!

Ao meu pai, Sebastião André, a minha mãe, Maria José,
e ao meu irmão, André José, os pilares da minha vida!

A minha noiva, amiga, companheira e eterna namorada,
Isabela Dias, minha flor, te amo!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A minha família: meu pai, Sebastião André; minha mãe, Maria José; ao meu irmão, André José, agradeço todo o amor, carinho, dedicação e apoio que sempre me deram no decorrer da minha vida. Foram fundamentais para me ajudar a chegar até aqui.

A minha noiva, Isabela Dias, agradeço o amor, carinho, amizade e muito paciência, dividindo comigo as dificuldades e superações desta etapa difícil que foi o mestrado.

Às minhas tias Rizete e Idalice (Dadau), que me apoiaram nos períodos difíceis, sempre me incentivando a estudar e a vencer na vida. Obrigado, minhas tias!

A minha orientadora, Profa. Dra. Clara Barbosa, seus ensinamentos, as críticas, a paciência e o profissionalismo, de grande valor para aprendizados, tanto profissionais quanto pessoais.

À amiga do doutorado, Raissa Ivna, a grande força, dividindo comigo as atividades da coleta, ajudando em disciplinas e na elaboração de artigos científicos, afora a ajuda durante momentos difíceis do mestrado.

Agradeço as orientações e grande força do Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, que com seus orientandos, Nayara Pontes, Elias Tibúrcio, Marconi Júnior e Morse Júnior, me receberam de braços abertos no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapias Experimentais (LEMTE), no Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (DG/UFPE).

Ao Prof. Dr. Marcos Oliveira e seus orientados, Marcelo Tigre, Ludmila e José Carlos, integrantes do Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, agradeço toda a ajuda prestada durante a pesquisa. Incluo Dona Sônia e Joana d'Arc, funcionárias do setor da Reprodução Animal do DMV da UFRPE.

À Profa. Dra. Eneida Wilcox, à Profa. Dra. Miriam Teixeira, ao técnico Clayton, às residentes Scheila, Rebeca e Mirza do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário do DMV-UFRPE, e à Profa. Dra. Emiko Mendes do Laboratório de Inspeção do Leite (DMV/UFRPE), toda a ajuda prestada durante o processamento e armazenamento das amostras da pesquisa.

Ao professor e grande amigo, Aderaldo Alexandrino de Freitas, que sempre esteve ao meu lado, desde o período da graduação e a ajuda prestada no período do mestrado, sua sala sempre disponível para estudos e pesquisas, seu tempo para conversas e discussões sobre o

mestrado, ou mesmo, os momentos valiosos de bate-papo sobre a vida. Muito obrigado por tudo, Deda!

Aos amigos de ontem, hoje e sempre, Paulinho, Pedro (Jimmy), Marquinho, Wagner, Pedrinho, Fernanda, Rhaysa, Carol e Rafaela. Apesar de estarmos trilhando caminhos diferentes, sempre estamos conversando e apoiando uns aos outros.

Ao grande amigo Elton Hugo, a grande força e amizade, enfrentando comigo os desafios do mestrado desde o início, com as correrias da inscrição e das provas classificatórias. Foi ele quem primeiro me deu a notícia da aprovação no mestrado, participamos de algumas disciplinas juntos, conversamos e desabafamos sobre nossas situações difíceis, e agora estamos concluindo esta jornada.

Ao Dr. Silvio Lins, a amizade. Sempre me abriu portas para meu caminho. Desde a época em que foi meu professor na Escola Agrotécnica Federal até os dias atuais, com grande ajuda durante as coletas no Abatedouro de Paulista. Também agradeço a todos(as) os(as) trabalhadores(as) do abatedouro de Paulista a ajuda prestada durante o período da coleta.

Ao Diretório Acadêmico de Medicina Veterinária, a oportunidade de poder construir algumas gestões e beber de uma fonte de conhecimento paralela ao currículo formal do Curso de Medicina Veterinária. Fonte essa que me ajudou a vivenciar várias situações ligadas à Educação, Universidade Pública, Política, a importância de uma greve, diversos Movimentos Políticos e Sociais, Assentamentos Rurais, quem são os(as) assentados(as), Reforma Agrária etc., experiências essas inesquecíveis e extremamente importantes para minha formação humana e profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), as oportunidades e o aprendizado no decorrer da graduação em Medicina Veterinária e em Licenciatura em Ciência Agrícolas, e agora no Curso de Mestrado em Ciência Veterinária. A todos(as) que fazem parte do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, estudantes, professores(as), funcionários(as), trabalhadores(as) terceirizados, comunidade, tutores(as) e seus animais, agradeço os valiosos ensinamentos profissionais, sociais e humanos.

À Dra. Taís Fukuta da Cruz e ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu), a fundamental ajuda com as análises laboratoriais da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), o financiamento da bolsa de pós-graduação.

Que a Universidade se pinte de negro, que se pinte de mulato; não só entre os alunos, mas também entre os professores; que se pinte de operários e camponeses, que se pinte de povo!

(Ernesto “Che” Guevara)

RESUMO

O *Circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovírus*. O vírus subdivide-se em: *Circovírus suíno-1* (PCV1) e *Circovírus suíno-2* (PCV2). O PCV1 não é patogênico, ao contrário do PCV2, que é um dos mais importantes agentes etiológicos da suinocultura moderna, estando associado a várias doenças. Essa complexidade de distúrbios causados pelo PCV2 gera uma demanda por técnicas laboratoriais e mais opções de amostras biológicas que venham a facilitar o diagnóstico e monitoramento sanitário dos rebanhos. A técnica do ELISA vem destacando-se na investigação de anticorpos contra o PCV2, diante de outras técnicas sorológicas, em razão de sua simplicidade, alta sensibilidade e especificidade. Dentre as ferramentas moleculares, a Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) destaca-se principalmente por mensurar a carga viral da amostra. O fluido oral (FO) é uma amostra biológica que vem sendo cada vez mais utilizada na suinocultura por diminuir o estresse e favorecer o bem-estar animal. O PCV2 foi identificado recentemente no Brasil, e a região Nordeste ainda apresenta poucos estudos sobre a dinâmica do respectivo vírus. Baseado nesses aspectos, objetivou-se estudar o PCV2 pelas técnicas de ELISA indireto com anticorpo de captura e de qPCR em suínos, por meio de amostras de soro e FO, respectivamente. As amostras foram oriundas do Abatedouro Municipal da cidade de Paulista, localizado na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco. As amostras de soro foram coletadas durante o processo da sangria, no qual foi obtido um total de 74 amostras. Essas foram avaliadas pela técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura. As amostras de FO foram obtidas de suínos que estavam alojados nas baias de descanso. Foi coletado um total de 60 amostras, as quais foram submetidas ao teste do qPCR. Das amostras de soro analisadas, tiveram o índice do ELISA considerado baixíssimo 14 (18,92%), baixo 13 (17,57%), moderado 11 (14,86%) e alto 36 (48,65%). Das amostras de FO, apresentaram o DNA do vírus 13,34% (8/60). Dessas, 75% (6/8) apresentaram uma carga viral muito baixa, até 4 (log)/mL da amostra, e uma carga viral baixa 25% (2/8), de 4 a 5 (log)/mL da amostra. A ocorrência de anticorpos e a presença do PCV2 nas amostras de FO sugerem que o vírus está circulante em rebanhos do estado de Pernambuco. Este estudo traz argumentos para a aplicação do ELISA indireto por anticorpo de captura em pesquisas sorológicas e utilização do FO de suíno como amostra biológica em testes quantitativos.

Palavras-chave: Anticorpo. Antígeno. Carga viral. Diagnóstico. Fluido oral.

ABSTRACT

Porcine circovirus (PCV) belongs to the *Circoviridae* family and *Circovirus* genus. The virus can be subdivided into *porcine circovirus-1* (PCV1) and *porcine circovirus-2* (PCV2). PCV1 is non-pathogenic, whereas PCV2 is one of the most important etiological agents in the pig industry today, and the cause of several diseases. The complexity of PCV2 caused by disturbances has led to a demand for laboratory techniques and a wider range of biological samples that can facilitate diagnosis and herd health monitoring. Research studies of the antibodies against PCV2 have preferred the ELISA technique to other serological methods because of its simplicity, high sensitivity and specificity. Among the molecular tools, the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) stands out since it makes it possible to measure the viral load of the sample. The oral fluid (FO) is a biological sample that has been increasingly used in pig farming as it reduces stress and improves animal welfare. Although PCV2 has been recently detected in Brazil, the North-East region has still not carried out many studies on the dynamics of the respective viruses. In view of this, the aim of this research is to study PCV2 by means of indirect ELISA with the capture antibody and qPCR in pigs through serum and FO, respectively. The samples were obtained from the Municipal Slaughterhouse in the town of Paulista, located in the metropolitan district of Recife, Pernambuco State. Serum samples were collected during the bleeding process, and a total of 74 samples were obtained. These were assessed by means of the ELISA technique with the capture antibody. The FO samples were obtained from pigs that were housed in stalls to rest. A total of 60 samples were collected, and these were subjected to qPCR testing. The serum samples that were analyzed, had measurements in the ELISA index as follows: very low - 14 (18.92%), low - 13 (17.57%), moderate - 11 (14.86%) and high - 36 (48.65%). The FO samples showed the DNA of the virus as 13.34% (8/60). 75% (6/8) of these had a very low viral load of 4 (log) / ml of the sample and a low viral load 25% (2/8) 4 to 5 (log) / ml sample. The occurrence of antibodies and the presence of PCV2 in the FO samples suggest that the virus is spreading in the herds of Pernambuco State. This study provides a strong argument for the application of ELISA for capture antibody in serological tests and using pigs to obtain biological FO samples in quantitative tests.

Keywords: Antibody. Antigen. Diagnosis. Oral fluid. Viral charge.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	<i>Circovírus suíno</i>	12
2.1.1	Histórico	12
2.1.2	Agente etiológico	12
2.1.3	Epidemiologia	13
2.1.4	Doenças associadas ao <i>Circovírus suíno-2</i>	14
2.1.4.1	<i>Infecção subclínica</i>	15
2.1.4.2	<i>Infecção clínica</i>	15
2.1.5	Diagnóstico	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
	REFERÊNCIAS	20
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	24
4.1	Artigo 1 – Detecção de anticorpos contra o <i>Circovirus suíno - 2</i> (PCV2) em soros de suínos pela aplicação da técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura	24
4.2	Artigo 2 – Detecção do DNA do <i>Circovirus suíno</i> (PCV) no fluido oral de suínos pela técnica da PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	38

1 INTRODUÇÃO

O sistema de produção de suínos nos últimos anos passou por uma intensa transformação, principalmente no que diz respeito ao manejo, à genética, à nutrição e à sanidade (BARBOSA, 2005). Todo esse desenvolvimento na criação também gerou pontos críticos, tais como a alta densidade populacional causando grande estresse nos animais, a homogeneização genética e a grande geração de resíduos nas granjas, levando a um risco permanente de insegurança biológica nas criações (TRUJILLO, 1996; SOBESTIANSKY, 2002; MIRANDA, 2007; JALFIM, 2008). Situações essas que predisõem o aparecimento de várias doenças, principalmente as de caráter infeccioso, dentre elas, as doenças associadas ao *Circovírus suíno-2* (PCV2) (BARBOSA, 2005).

Atualmente, o PCV2 está entre os patógenos de maior relevância na suinocultura por seu grande impacto negativo, gerando grandes perdas econômicas (FERREIRA; SILVA, 2010; CARRIJO, 2012). Várias doenças estão associadas ao PCV2, sendo denominadas de PCVD (do inglês *porcine circovirus diseases*). Segalés (2012) classifica tais doenças em Infecção Subclínica, na qual o animal não desenvolve manifestações clínicas, ocorrendo apenas perdas produtivas, e em Infecção Clínica, podendo ocorrer o desenvolvimento de várias síndromes, dentre essas: a doença sistêmica, representada pela síndrome multissistêmica do definhamento suíno (SMDS); doenças respiratórias, na qual se enquadram as manifestações clínicas e coinfeções com outros agentes que prejudicam esse sistema; Doenças Digestivas causam principalmente diarreia e emagrecimento; doenças reprodutivas, gerando abortos e leitões natimortos; e a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS). A SMDS é a principal doença associada ao PCV2. Essa síndrome acomete os leitões nas fases de creche e crescimento e tem como sinais clínicos mais comuns a caquexia, linfadenopatia, dispneia, diarreia, icterícia e palidez das mucosas (CRUZ, 2010; BARBOSA et al., 2011).

O diagnóstico das doenças associadas ao PCV2 é complexo pelo fato de haver vários órgãos e sistemas envolvidos, gerando quadros clínicos com sinais inespecíficos, havendo também um comprometimento do sistema imunológico, no qual pode também ocorrer coinfeções de outros agentes patogênicos que dificultam o diagnóstico e compromete a elaboração de programas de prevenção e controle de tais doenças. Assim, é fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas laboratoriais para auxiliar no monitoramento e diagnóstico das PCVD (BARBOSA, 2005).

O diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas geralmente se baseia na análise dos produtos sanguíneos, tornando necessária a coleta de sangue e com isso seus percalços, com

investimentos em treinamentos específicos dos técnicos e em equipamentos especiais, podendo ainda gerar prejuízos na coleta e na qualidade das amostras em razão do estresse provocado nos animais submetidos à prática (BARBOSA, 2005; PRICKETT et al., 2008). A amostra do fluido oral do suíno é uma mistura da saliva e do transudado da mucosa oral, rica em anticorpos (PRICKETT et al., 2008; PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010). A coleta do fluido oral é um método recomendável por sua simplicidade, segurança e por favorecer o bem-estar dos suínos, mostrando ser dessa forma uma possível amostra biológica substituta do sangue, ampliando as possibilidades de testes diagnósticos e monitoramento sanitário do rebanho na suinocultura (BARBOSA et al., 2013).

Com base em estudos sorológicos, presume-se que infecção pelo PCV2 é ubíqua, ou seja, está presente em todo o mundo (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005). No Brasil, o PCV2 foi identificado pela primeira vez em 2000 (CIACCI-ZANELLA et al., 2003), mas estudos retrospectivos indicam que o agente está circulante no país em materiais que datam de 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006), e muito mais antigos, em amostras de tecidos de 1978 (SILVA et al., 2011). Atualmente a infecção pelo PCV2 é endêmica no País (NASCIMENTO, 2009).

O PCV2 é um agente etiológico que apresenta carência de estudos na região Nordeste, visto que sua identificação e descrição de doenças associadas a ele são recentes no país, além de os estudos envolvendo o vírus serem realizados, na maioria, nas regiões Sul e Sudeste. Barbosa et al. (2010) pesquisaram anticorpos contra o PCV2 em 353 amostras de soros de suínos não vacinados oriundas de cinco estados do Nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte) e encontraram reatividade em 86,7% das amostras. Todos os estados apresentaram amostras reativas. Essa informação nos mostra que o vírus está circulante na região Nordeste e estudos mais detalhados precisam ser realizados nos estados para se conhecer a situação sanitária dos rebanhos.

Portanto, a complexidade das doenças associadas ao PCV2 demanda pelo desenvolvimento de novas ferramentas laboratoriais e mais opções de amostras biológicas em alternativa ao sangue para auxílio no diagnóstico e monitoramento do agente na suinocultura. Somado a esses fatores, a escassez de informações sobre a dinâmica do vírus na região Nordeste demanda pesquisas sobre o agente. Baseado nesses aspectos, objetivou-se estudar o PCV2 pelas técnicas de ELISA indireto com anticorpo de captura e de qPCR em suínos mediante amostras de soro e de FO respectivamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Circovírus suíno*

2.1.1 Histórico

O PCV foi descoberto em 1974, por Tischer, Rasch e Tochtermann (1974) em células de linhagem porcine kidney – 15 (PK-15) de suínos. Por se tratar de um vírus com uma única cadeia de DNA, circular e com suas extremidades ligadas covalentemente, foi sugerida a criação de uma família denominada *Circoviridae* (TISCHER et al., 1982; SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

No Canadá, Clark (1997) apresentou a relação do PCV com uma doença denominada de postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (em português: síndrome multissistêmica do definhamento de suínos – SMDS). Posteriormente, o genoma do PCV associado à SDMS foi sequenciado e observou-se a existência de diferenças relevantes entre os vírus (HAMEL; LIN; NAYAR, 1998; SEGALÉS; DOMINGO, 2002). Então, o PCV associado à contaminação de células PK-15 foi denominado de *Circovirus suíno-1* (PCV1) e o PCV associado à SMDS foi denominado de *Circovirus suíno-2* (PCV2) (ALLAN et al., 1999; SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

No Brasil, o PCV2 foi identificado pela primeira vez em 2000, no Laboratório de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA et al., 2003; CIACCI-ZANELLA, 2007; MORÉS, 2007). Apesar de ter sido reportado pela primeira vez em 2000, o vírus foi identificado em materiais de arquivo de 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006) e em tecidos arquivados dos anos de 1978 e 1979 (SILVA et al., 2011), sugerindo que a infecção já estava presente anteriormente no Brasil.

2.1.2 Agente etiológico

O *Circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*. O vírus subdivide-se em dois tipos, o PCV1 e o PCV2. O PCV1 não é patogênico, ao contrário do PCV2 (ALLAN; ELLIS, 2000; TODD, 2000; CIACCI-ZANELLA, 2007). Além do PCV1 e PCV2, existem mais três *Circovírus* que acometem aves: o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), o vírus da doença das penas e bico dos psitacídeos (BFDV) e o *Circovírus*

dos pombos (PiCV) (ALLAN; ELLIS, 2000; TODD, 2000; CIANNI-ZANELLA et al., 2003; MORÉS et al., 2007; CIANNI-ZANELLA, 2007).

O PCV é um vírus, com diâmetro de 15 a 17nm, de simetria icosaédrica, não envelopado. O DNA é de fita simples com forma circular, covalentemente fechado, com senso positivo, tendo peso molecular de $0,56 \times 10^6$ Daltons e tem genoma com 1.760 nucleotídeos. As principais regiões de leitura aberta (ORF do inglês Open Reading Frame) do PCV são a ORF-1 e ORF-2. Por meio da ORF-1, são produzidas duas proteínas com envolvimento na replicação viral, a Rep e Rep'. A ORF-1 é conservada entre o PCV1 e PCV2, apresentando similaridade de 83% na sequência dos nucleotídeos e 86% na sequência de aminoácidos. A ORF-2 codifica uma proteína envolvida na formação do capsídeo viral, com grande potencial para ser utilizada na detecção do PCV2 (ALLAN; ELLIS, 2000; CASTRO et al., 2007; CIACCI-ZANELLA, 2007; CRUZ, 2010). Além da ORF-1 e ORF-2, a ORF-3 representa uma área de codificação de uma proteína não estrutural com função ligada com a apoptose (LIU et al., 2006; FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2009), e mais recentemente, a ORF-4, que tem função na replicação viral e patogenicidade (GAO et al., 2013). Além dessas, existem ainda outras ORFs (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), que ainda não se conhecem bem suas funções (CASTRO et al., 2007).

2.1.3 Epidemiologia

Estudos sorológicos no Brasil e em outros países indicaram que anticorpos contra o PCV2 estão presentes na maioria dos rebanhos suínos (rebanhos livres de patógenos específicos [SPF], unidades de terminação e criações de fundo de quintal), e a maior parte dos animais se infecta ao redor da terceira e quarta semanas após o desmame. Suídeos selvagens, como os javalis, também são suscetíveis à infecção pelo PCV2 e desenvolvem a SMDS quando submetidos a estresse e a outros fatores de risco (CIACCI-ZANELLA, 2007; MORÉS et al., 2007).

Os suínos são mais frequentemente afetados pela SMDS entre as 5 e 16 semanas de idade, e a morbidade e mortalidade variam de acordo com a fase em que a doença surge e com o manejo da criação, podendo a morbidade chegar até 70% e a mortalidade até 30%. O principal problema da SMDS é sua duração nos rebanhos, podendo persistir por vários meses se medidas apropriadas de controle não forem adotadas. Há um aumento de três vezes nas taxas de mortalidade na creche e no crescimento-terminação. Em alguns rebanhos, essas taxas

retornam à normalidade dentro de alguns meses (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; CIACCI-ZANELLA, 2007, MORÉS et al., 2007).

O PCV2 pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical, sendo a via oronasal a rota mais frequente de transmissão. O PCV2 é excretado nas fezes por até treze dias após a infecção. Os *Circovírus* são muito resistentes às condições ambientais e aos desinfetantes. Portanto, o contato direto ou indireto com suínos infectados, instalações, equipamentos, pessoal contaminado e fômites também podem transmitir o agente (CIACCI-ZANELLA, 2007; MORÉS et al., 2007).

A detecção de PCV2 em swab nasal, tonsilar, brônquico, urinário e fecal sugere que as vias de transmissões podem ser as secreções oronasal, fecal e urinária de animais com e sem sinais clínicos da SMDS. No entanto, quando o animal apresenta sinais clínicos a excreção do vírus é mais intensa. O PCV2 foi isolado de fetos abortados no fim da gestação e natimortos. Experimentos demonstraram que o vírus pode causar anormalidades nos fetos em diferentes fases da gestação (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005; CASTRO et al., 2007).

A SMDS é considerada uma doença multifatorial, tendo vários fatores de riscos infecciosos e não infecciosos; principalmente predisponentes ao estresse, como densidade elevada, variações térmicas extremas, frio, baixa qualidade do ar, ar seco, e mistura de lotes com idades diferentes podem exacerbar os sinais e a severidade da doença. Nos países onde o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) é endêmica, a coinfeção com o PRRSV foi detectada na maioria dos plantéis, exacerbando a SMDS. Outros agentes, como o *Haemophilus parasuis*, até então pouco diagnosticados na suinocultura brasileira, passaram a ter grande importância após o surgimento das doenças associadas ao PCV2. A infecção pelo *Parvovirus suíno* (PPV) também parece ser um importante cofator para o agravamento da SMDS (CIACCI-ZANELLA, 2007; MORÉS et al., 2007).

Além da SMDS, antígenos do PCV2 estão sendo encontrados em associação com as lesões no sistema respiratório, em distúrbios reprodutivos e/ou abortamentos em porcas, dentre outras doenças (ALLAN; ELLIS, 2000; CRUZ, 2010).

2.1.4 Doenças associadas ao *Circovírus suíno-2*

Várias doenças estão associadas ao PCV2, sendo denominadas de PCVD (do inglês, *porcine circovirus diseases*). Segalés (2012) classifica tais doenças em Infecção Subclínica e Infecção Clínica.

2.1.4.1 Infecção subclínica

Com base em estudos sorológicos, presume-se que a infecção pelo PCV2 é ubíqua em todo o mundo enquanto a prevalência da doença clínica é muito menor. A forma mais comum de manifestação PCV2 é a infecção subclínica. Mesmo sem sinais clínicos aparentes, as perdas nos índices zootécnicos são perceptíveis – ganho de peso, conversão alimentar, condição corporal, peso de carcaça, etc. (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005; SEGALÉS, 2012).

2.1.4.2 Infecção clínica

Várias síndromes clínicas têm sido associadas à infecção pelo PCV2. A mais bem descrita é a SMDS, que é classificada como doença sistêmica. Outras condições patológicas foram a síndrome da dermatite e nefropatia suína, distúrbios reprodutivos, pneumonia proliferativa e necrosante, doenças respiratórias e digestivas. Essas doenças foram denominadas doenças associadas ao *Circovírus* (PCVD, do inglês *porcine circovirus diseases*).

a) Doença sistêmica – a SMDS é a síndrome mais bem detalhada das PCVD. O PCV2, geralmente, infecta os suínos com cinco a dezesseis semanas de idade, frequentemente pela via oronasal. O vírus infecta células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas, e é capaz de replicar em vários tipos celulares, preferencialmente em células com divisão ativa. Após a infecção e replicação em células do sistema imunológico, o PCV2 produz viremia e se dissemina sistemicamente no organismo. Pela incapacidade do animal infectado desenvolver uma resposta imunológica efetiva, o PCV2 pode infectar células em vários órgãos, produzir lesões e, assim, agravar o quadro clínico. Um desequilíbrio das substâncias mediadoras da imunidade, morte de linfócitos e falhas na reposição de células linfóides colaboram para essa imunodeficiência. Ainda não está claro por que apenas uma parcela dos leitões infectados desenvolve a doença. A explicação pode estar relacionada com a presença de cofatores infecciosos e não infecciosos, que são responsáveis pelo aumento dos níveis de replicação do PCV2 nos suínos com SMDS (CIACCI-ZANELLA, 2007; MORÉS et al., 2007).

Do ponto de vista clínico, três fatores principais são sugeridos para explicar a grande variação no número de animais afetados por lote: o efeito individual, o efeito leitegada e o efeito manejo (fatores de risco). O efeito individual é decorrente da genética individual do

animal e sua capacidade de responder adequadamente às infecções. O efeito leitegada sugere um importante papel da matriz como possível reservatório do vírus e/ou na transferência de imunidade passiva aos leitões. O efeito manejo ou fatores de risco causadores de estresse, como densidade elevada, ambiente inadequado, baixa qualidade do ar, da água e da ração, mistura de leitões de procedência e idades diferentes, falhas na limpeza/desinfecção e a não realização de vazio sanitário são muito importantes (CIACCI-ZANELLA, 2007).

Os sinais clínicos que são observados em leitões infectados são o emagrecimento rápido e progressivo, apatia, anorexia, o pelo opaco, dispneia, conjuntivite, palidez e icterícia da pele e mucosas, sinais de pneumonia, diarreia e caquexia (CIANNI-ZANELLA, 2007; MORÉS et al., 2007).

b) Doença respiratória – o distúrbio caracteriza-se por crescimento vagaroso e irregular, redução no consumo alimentar, alta conversão alimentar, tosse e pneumonia, acometendo leitões entre dezesseis e vinte semanas de idade. O principal sinal clínico é a dificuldade respiratória, sendo um sinal clínico facilmente presente na doença sistêmica. Os principais patógenos envolvidos no desenvolvimento desse quadro são o Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRSV) e o *Mycoplasma hyopneumoniae*. No entanto, outros agentes, também, foram detectados em surtos, dentre eles o PCV2 (CASTRO et al., 2007; MORES, 2010; SEGALÉS, 2012).

c) Doença digestiva – o principal sinal clínico é a diarreia, levando o animal à diminuição da taxa de crescimento, aumento da conversão alimentar, emagrecimento, sinais também presentes na doença sistêmica (SEGALÉS, 2012).

d) Doença reprodutiva – as granjas acometidas apresentam taxas elevadas de abortamento, fetos mumificados e leitões natimortos. O PCV2 é detectado nos tecidos fetais e em lesões cardíacas de leitões com miocardites mediante técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), imuno-histoquímica e isolamento viral (CASTRO et al., 2007; SEGALÉS, 2012).

e) Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS) – suínos afetados com a SDNS são clinicamente anoréxicos e deprimidos. Eles podem apresentar prostração, relutância em se mover e/ou exibir andar rígido. O sinal mais evidente é a presença de máculas e pápulas vermelhas-para-roxo irregulares na pele, principalmente sobre os membros posteriores e a área perineal, mas, por vezes, mais geralmente distribuídas. Com o tempo, as lesões tornam-se cobertas por crostas escuras. A SDNS pode afetar suínos na creche, em crescimento e os animais adultos. A mortalidade pode chegar a 100% em suínos com mais de três meses de idade, e aproximadamente 50% nos animais mais jovens afetados de forma aguda tendem a

morrer dentro de alguns dias após o início dos sinais clínicos; suínos sobreviventes tendem a se recuperar e ganhar peso em sete ou dez dias após o início da síndrome (BRITO et al., 2002; SEGALÉS, 2012).

2.1.5 Diagnóstico

Pelo fato de a SMDS cursar com sinais variados e produzir imunossupressão que predispõe a ocorrência de outras doenças, o diagnóstico deve ser embasado em três aspectos: os sinais clínicos (emagrecimento progressivo, problemas respiratórios e/ou diarreia); lesões (macroscópicas: aumento de volume de linfonodos, hipotrofia do timo e consolidação pulmonar com pulmões não colabados e microscópicas: depleção de linfócitos nos linfonodos e baço, infiltração de histiócitos, pneumonia intersticial. A presença de corpúsculos de inclusão basofílicos no citoplasma de macrófagos tem valor diagnóstico limitado, pois aparece somente em cerca de 30% dos casos); e achados laboratoriais – métodos diretos ou indiretos (CIACCI-ZANELLA, 2007).

O diagnóstico laboratorial da infecção por PCV2 pode ser realizado mediante métodos diretos (Isolamento Viral e técnicas de Biologia Molecular). O diagnóstico pela técnica de Isolamento Viral é feito por meio de amostras de pulmão, amígdala, timo, baço, íleo, linfonodos, fígado e rim de animais suspeitos. Nesse caso, culturas celulares de rim de suíno PK-15 não infectadas com PCV-1. As técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase são realizadas para a confirmação do isolamento, pois o agente não produz efeito citopático nos cultivos celulares. Diante das dificuldades associadas à técnica de Isolamento Viral, têm-se priorizado estudos com técnicas de diagnósticos que visam à detecção de antígenos ou DNA viral, tais como as ferramentas de biologia molecular (ALLAN; ELLIS, 2000; CASTRO et al., 2007).

A hibridização *in situ* baseia-se na utilização de sondas de ácidos nucleicos, com ou sem marcadores radioativos, para localizar sequências específicas de DNA/RNA em tecidos ou células. Essa técnica foi utilizada para detectar PCV2 em lesões histológicas da SMDS, inclusive em tecidos em parafina, permitindo a realização de estudos retrospectivos (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; CASTRO et al., 2007).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é considerada uma importante ferramenta laboratorial para a identificação do PCV. Novas variações do PCR vêm aumentando a sensibilidade e especificidade da técnica, como a Multiplex – PCR (LAROCHELLE et al., 1999), Nested-PCR (NPCR) (KIM et al., 2001) e NPCR em Único Tubo (STNPCR)

(PONTES et al., 2014). Pelo fato de a carga viral do PCV está sendo relacionada com a severidade clínica das doenças associadas ao vírus, técnicas quantitativas, como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), estão sendo cada vez mais utilizadas. Essa ferramenta se mostra mais prática, mais sensível, mais segura contra contaminação e mais confiável que a técnica convencional, podendo auxiliar no diagnóstico e no estudo da dinâmica da doença *in vivo*, como também em monitoria sanitária de rebanhos (OLVERA et al., 2004; CRUZ, 2006; MCINTOSH et al., 2009; SEGALÉS, 2012; LI; KAWASHIMA; KATSUDA, 2016).

Técnicas laboratoriais têm sido utilizadas também para a detecção de anticorpos contra PCV2 no soro de suínos, dentre elas, as mais utilizadas são a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e a técnica imunoperoxidase em monocamada (IPMA) (ALLA; ELLIS, 2000; CASTRO et al., 2007; CRUZ, 2010). Essas ferramentas são bastante laboriosas em seu preparo e desenvolvimento, necessitando de profissionais bem treinados. Porém, a técnica do ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) vem desenvolvendo-se e sendo cada vez mais utilizadas para esse fim, mostrando-se mais rápida, simples, de menor custo, com alta sensibilidade e especificidade, sendo mais favorável a pesquisa em grande escala (CASTRO et al., 2007; CRUZ, 2010; PILERI et al., 2014).

Diversas amostras biológicas vêm sendo utilizadas em testes laboratoriais, sangue total, soro, secreção nasal, fezes, sêmen, tecidos (pulmão, baço, nódulos linfáticos, fígado, dentre outros) e o fluido oral (FO) (CIACCI-ZANELLA et al., 2006; CRUZ, 2010; PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010; PONTES et al., 2014). O FO é o termo utilizado para nomear o líquido incolor e viscoso presente na cavidade oral dos seres humanos e nos animais. Trata-se de uma mistura complexa, que contém saliva e outros fluidos provenientes dos capilares sanguíneos presentes na mucosa oral e tecido gengival. O FO vem sendo utilizado em diversas áreas da Saúde, apresentando-se como uma técnica não invasiva, segura, prática e de baixo custo (HODINKA et al., 1998; KAUFMAN; LAMSTER, 2002; DELIMA; VAN DIKE, 2003; PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010; BADIYANI; KUMAR; MARU, 2013). Na Medicina Veterinária, a utilização do FO propicia uma diminuição do estresse favorecendo o bem-estar animal. A coleta do FO pela técnica das cordas de algodão é um processo simples, não invasivo e de baixo custo, pois é facilitada pelo comportamento natural do suíno (ZIMMERMAN, 2012; BARBOSA et al., 2013; SCHAEFER et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o *Circovirus suíno-2* (PCV2) pelas técnicas de ELISA indireto com anticorpo de captura e PCR em tempo real em suínos.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de anticorpos para o *Circovirus suíno-2* (PCV2) em amostras de soro pela técnica de ELISA indireto com anticorpo de captura;
- Detectar a presença do *Circovirus suíno* (PCV) em amostras de fluido oral pela técnica de PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. M. et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1-11, 1999.
- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 3-14, 2000.
- BADIYANI, B.; KUMAR, A.; MARU, V. P. Role of saliva in dental practice: a review. **Research and Reviews: Journal of Dental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013.
- BARBOSA, C. N. **Circovírus suíno tipo-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos**. 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas Gerais, 2005.
- _____ et al. Serological survey on porcine circovirus type 2 (PCV2) in commercial swine farms located in the Northeastern States of Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 21., 2010, Vancouver, Canadá. **Anais...** Vancouver: IPVS, 2010. p. 336.
- _____ et al. Pesquisa de antígenos e anticorpos contra Circovírus suíno II em suínos com e sem sintomatologia da síndrome multisistêmica do definhamento em granjas comerciais mineiras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1513-1526, 2011.
- _____ et al. Aplicação da metodologia de coleta do fluido oral em suínos mestiços. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 7, n. 3, p. 32-38, 2013.
- BRITO, L. P. B. et al. Síndrome da dermatite e nefropatia suína. In: SOBESTIANSKY, J. et al. (Ed.). **Circovirose suína e circovírus suíno**. Goiânia, GO: [s. n.], 2002. p. 44-51.
- CARRIJO, K. de F. **Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovírus suíno tipo 2 em tecidos pulmonar, renal e linfóide e de *Leptospira spp.* em suínos abatidos sob inspeção sanitária**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2012.
- CASTRO, A. M. M. G. et al. Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 281-291, 2007.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. *Circoviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, 2007. cap. 13, p. 361-374.
- _____ et al. Estudo da ocorrência de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em suínos vivos ou em materiais com suspeita clínica de circovirose suína enviados para o diagnóstico. **Comunicado Técnico**, Ministério da Agricultura, Concórdia (SC), n. 339, dez. 2003.
- _____ et al. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.

CLARK, E. G. Post weaning multisystemic wasting syndrome. **Proceedings American Association of Swine Practice**, v. 28, p. 499-501, 1997.

CRUZ, T. F. da. **Quantificação do circovirus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

_____. **Padronização e aplicação da técnica de ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) indireto com anticorpo de captura para a detecção de anticorpos contra o circovírus suíno tipo 2**. 2010. 87 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010.

DELIMA, A. J.; VAN DYKE, T .E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 31, p. 55-76, 2003.

FERREIRA, A. S.; SILVA, F. C. de O. Suinocultura com foco na agricultura familiar. **Informe Agropecuário: tecnologias para a agricultura familiar: produção animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 256, p. 78-84, 2010.

FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circovirus-small but powerful. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 177-183, 2009.

GAO, Z. et al. Identification and characterization of two novel transcription units of porcine Circovirus 2. **Virus Genes**, v. 47, p. 268-275, 2013.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. S. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology** v. 72, n. 6, p. 5262-5267, 1998.

HODINKA, R. L.; NAGASHUNMUGAM, T.; MALAMUD, D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 5, n. 4, p. 419–426, 1998.

JALFIM, F. T. **Agroecologia e agricultura familiar em tempos de globalização: o caso dos sistemas tradicionais de criação de aves no semi-árido brasileiro**. Recife: Ed. do Autor, 2008. 160 p.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva: a review. **Oral Biology & Medicine**, Alexandria, v. 13, n. 2, p. 197-212, 2002.

KIM, J. et al. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 98, p. 25-31, 2001.

LAROCHELLE, R. et al. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 1999.

LI, Y.; KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K. Correlation of viral load with lesion severity in field pigs affected with porcine circovirus type 2. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 3, p. 192-198, 2016.

LIU, J. et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal Virology**, v. 80, n. 10, p. 5065-5073, 2006.

MCINTOSH, K. A. et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in sérum, buffy coat, feces and multiple tissues. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p.23-33, 2009.

MIRANDA, C. R. de. Aspectos ambientais da suinocultura brasileira. In: SEGANFREDO, M. A. (Ed.). **Gestão ambiental na suinocultura**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2007. cap. 1, p. 13-36.

MORES, M. A. Z. Pneumonias em suínos. In: ALBERTON, G. C.; ZOTTI, E. (Org.) **Tópicos em sanidade e manejo suínos**. Campinas, SP: Sanphar, 2010. p. 13-82.

MORÉS, N. et al. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.). **Doenças dos suínos**. Goiânia, GO: Cânône Editorial, 2007. p. 213-225.

NASCIMENTO, J. A. F. B. **Análise filogenética do circovírus suíno do tipo 2 no Brasil**. 2009.127 f. Tese (doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

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, p. 75-80, 2004.

PILERI, E. et al. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 429-432, 2014

PONTES, N. E. et al. Development and evolution of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the detection of Porcine circovirus type 2 (PCV2). **Transboundary and Emerging Diseases**, v.. 61, n. 3, p. 233-238, jun. 2014.

PRICKETT, J. R. et al. Oral-fluid sampels for suveillance of comercial growing pigs for procine reproductive and respiratory syndrome vírus and porcine circovirus type 2 infections. **Journal of Swine Health and Production**, v.1, p. 86-91, 2008.

PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, J. J. The development of oral fluid-based diagnostics and application in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 11, n. 2, p. 207-216, 2010.

SCHAEFER, R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 61-73, 2013.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, p. 10-19, 2012.

_____; DOMINGO, M. Circovirose suína e circovírus suíno. In: SOBESTIANSKY, J. et al. (Ed.). **Circovirose suína e circovírus suínos**. Goiânia, GO: [s. n.], 2002. p. 29-33.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.137-149, 2004.

_____; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine Circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.

SILVA, F. M. F. da. et al. Retrospective study on porcine circovirus-2 by Nested PCR and real time PCR in archived tissues from 1978 in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 42, p. 1156-1160, 2011.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema intensivo de produção de suínos**: programa de biossegurança. Goiânia, GO: Ed. do Autor, 2002. 107 p.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Abt. 1 Originale A, v. 226, p. 153-167, 1974.

TISCHER, I. et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, n. 5844, p. 64-66, 1982.

TODD, D. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 5, p. 373-394, 2000.

TRUJILLO, R. G. **Los animals en los sistemas agroecológicos**. La Habana (Cuba): Pan para el Mundo, 1996. 100 p.

ZIMMERMAN, J. Monitorando doenças infecciosas em planteis de suínos por meio de amostras de fluidos orais. **Suínos & CIA**, n. 44, p. 26-31, 2012.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Artigo 1

Detecção de anticorpos contra o *Circovírus suíno-2* (PCV2) em soros de suínos pela aplicação da técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura

Resumo: O *Circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*. O vírus subdivide-se em dois tipos, o *Circovírus suíno-1* e o *Circovírus suíno-2*, PCV1 e PCV2 respectivamente. O PCV2 está entre os patógenos de maior relevância sanitária na suinocultura. As técnicas laboratoriais mais utilizadas na detecção de anticorpos contra PCV2 são a imunofluorescência indireta (IFI) e a imunoperoxidase em monocamada (IPMA). Porém, a técnica do ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) vem desenvolvendo-se e sendo cada vez mais aplicada pelo fato de ser mais rápida, simples, com alta sensibilidade e especificidade, sendo favorável à pesquisa em grande escala. Em função do exposto, objetivou-se detectar a presença de anticorpos para o PCV2 em amostras de soro de suínos, pela técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura. As coletas realizaram-se no Abatedouro Municipal da cidade de Paulista, localizado na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco. Coletaram-se 74 amostras de soro. Do número total de amostras analisadas, tiveram o índice do ELISA 14 (18,92%), considerado baixíssimo, baixo 13 (17,57%), moderado 11 (14,86%) e alto 36 (48,65%). Concluiu-se que a ocorrência de anticorpos contra o PCV2 encontrado nas amostras pesquisadas sugere que esse vírus está circulante no estado de Pernambuco. Este estudo traz argumentos para a aplicação do ELISA em pesquisas sorológicas e também a necessidade de mais estudos de prevalência desse agente patogênico nos rebanhos de suínos do estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Anticorpo, Circovirose, Diagnóstico, Sorologia, Suíno.

Application of capture antibody from an indirect ELISA for the detection of antibodies in *Porcine circovirus – 2* (PCV2) in swine sera

Abstract: The *porcine circovirus* (PCV) belongs to the *Circoviridae* family and *Circovirus* genus. The virus is subdivided into two types, *porcine circovirus-1* and *porcine circovirus-2*, PCV1 and PCV2, respectively. PCV2 is among the pathogens that cause greatest concern with regard to health in pig farming. The laboratory techniques that are most often used in the detection of antibodies against PCV2 are indirect immunofluorescence (IFI) and immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). However, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) is a technique that is increasingly being applied, because it is faster and simpler, as well as having a high degree of sensitivity and specificity. Thus research has been conducted on a large scale and achieved positive results. The aim of this study was to evaluate the presence of PCV2 antibodies by antibody capture from indirect ELISA in swine sera from a slaughterhouse in Pernambuco State. Samples were collected from the Municipal Slaughterhouse of the town of Paulista, located in the metropolitan district of Recife, Pernambuco State. 74 serum samples were collected. The total number of samples analyzed can be subdivided as follows: 14 (18.92%) of those in the ELISA index were considered to be very low, 13 (17.57%) low, 11 (14.86%) moderate and 36 (48.65%) high. It can be concluded

that the high incidence of antibodies against PCV2 found in the samples surveyed, suggests that this virus is spreading in the State of Pernambuco. This study provides a strong argument for the application of ELISA serological tests and also shows the need for more studies to be carried out on the prevalence of this pathogen in herds of swine in Pernambuco State.

Keywords: Antibody. Circovirosis. Diagnostics. Serology. Swine.

INTRODUÇÃO

O *Circovírus suíno* (PCV) é um vírus não envelopado, com diâmetro de 15 a 17 nm, de simetria icosaédrica. Seu DNA é de fita simples com forma circular, covalentemente fechado, com senso positivo, tendo peso molecular de $0,56 \times 10^6$ Daltons e tem genoma com 1.760 nucleotídeos. O PCV pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*. O PCV subdivide-se em dois tipos virais, o *Circovírus suíno-1* e o *Circovírus suíno-2*, PCV1 e PCV2 respectivamente. O PCV1 não é patogênico, sendo contaminantes de células de linhagem (PK-15), ao contrário do PCV2, que é patogênico (ALLAN; ELLIS, 2000; TODD, 2000; CASTRO et al., 2007; CIACCI-ZANELLA, 2007).

Atualmente o PCV2 está entre os patógenos de maior relevância na suinocultura pelo seu impacto negativo na produção, gerando grandes perdas econômicas (FERREIRA; SILVA, 2010; CARRIJO, 2012). Várias doenças estão associadas ao PCV2, sendo denominadas de PCVD (do inglês, *porcine circovirus diseases*). Segalés (2012) classifica tais doenças em Infecção Subclínica, na qual os suínos apresentam perdas produtivas sem a presença de sinais clínicos e a Infecção Clínica, com uma variedade de distúrbios: Doença Sistêmica – emagrecimento progressivo e refugagem em leitões, onde se encaixa a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS). Doenças Respiratórias – associadas principalmente à pneumonia proliferativa e necrosante (PPN). Doenças Digestivas – associadas a enterites. Doenças reprodutivas – causando falhas reprodutivas, e a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS). A SMDS é a principal doença associada ao PCV2. Essa síndrome acomete os leitões nas fases de creche e em crescimento. Tem como sinais clínicos mais comuns a caquexia, linfadenopatia, dispneia, diarreia, icterícia e palidez das mucosas (CRUZ, 2010; BARBOSA et al., 2011).

As técnicas laboratoriais mais utilizadas na detecção de anticorpos contra PCV2 no soro de suínos são a imunofluorescência indireta (IFI) e a imunoperoxidase em monocamada, IPMA (ALLAN; ELLIS, 2000; CASTRO et al., 2007; CRUZ, 2010). Essas ferramentas são bastante laboriosas em seu preparo e desenvolvimento, necessitando de profissionais bem treinados, porém, a técnica do ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) vem

desenvolvendo-se e sendo cada vez mais utilizada para esse fim, mostrando-se mais rápida, simples, com alta sensibilidade e especificidade, sendo mais favorável à pesquisa em grande escala (WALKER et al., 2000; CASTRO et al., 2007; CRUZ, 2010; PILERI et al., 2014). Contudo, as pesquisas de anticorpos para o PCV2 envolvendo a técnica do ELISA ainda são escassas.

Walker et al. (2000) desenvolveram um sistema de ELISA competitivo baseado em anticorpo monoclonal específico para PCV2. Nawagitgul et al. (2002) descreveram o desenvolvimento de dois métodos de ELISA para a detecção de anticorpos anti-PCV2, um utilizando como antígeno suspensão viral oriunda de células infectadas com PCV2 (ELISA-PCV2) e o outro ELISA baseado no uso de uma proteína recombinante da região ORF-2 do PCV2 (ELISA-ORF-2). Blanchard et al. (2003) desenvolveram um ELISA indireto por meio de uma proteína do capsídeo viral codificada pela ORF-2 do PCV2, expressada por um baculovírus recombinante em cultivo celular. Na China, Yang et al. (2008) utilizaram um ELISA para a pesquisa de anticorpos contra a PCV2 em amostras de soro de suínos e encontrou uma soroprevalência de 40%. A técnica do ELISA também foi utilizada por Pozzi et al. (2008) em análises patológica e molecular para comprovar o envolvimento do PCV2 em leitões com sinais de refugagem em três rebanhos em Israel. No Brasil, Cruz (2010) padronizou a técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura em amostras proveniente de matrizes e em diferentes fases das respectivas leitegadas para a avaliação dos níveis de sorológicos do PCV2.

O PCV2 foi identificado e descrito no Brasil em 2000. Ainda não se sabe ao certo a prevalência dessa doença na suinocultura brasileira, mas o vírus pode estar circulante nas criações (CIACCI-ZANELLA; MORES, 2000). As pesquisas sorológicas devem ser realizadas em rebanhos com ou sem a presença de doenças associadas ao PCV2.

Estudos sorológicos ajudarão na compreensão sobre a circulação e dinâmica do vírus, as possíveis formas de transmissão, a soroconversão dos anticorpos nos leitões e sobre os melhores períodos para a vacinação (CASTRO et al., 2007; CRUZ, 2010). Partindo desses aspectos, objetivou-se detectar a presença de anticorpos para o PCV2 em amostras de soro de suínos pela técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da área estudada

O estado de Pernambuco situa-se na parte centro-leste da região Nordeste do Brasil, ocupando uma área de 98.281 km², limitando-se ao norte com os estados da Paraíba e do Ceará, a leste com o Oceano Atlântico, ao sul com os estados de Alagoas e Bahia e a oeste com o estado do Piauí. Pernambuco divide-se em quatro regiões: a Região Metropolitana do Recife (RMR), que envolve a capital e cidades vizinhas, a Zona da Mata, mais próxima ao litoral, o Agreste, área de transição para a região semiárida do estado e o Sertão, onde predomina o clima semiárido e o bioma da caatinga (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2013).

Obtenção dos espécimes sorológicos

As coletas realizaram-se no Abatedouro Municipal da cidade de Paulista, localizado no bairro de Artur Lundgren II, na RMR, no período de junho a novembro de 2014. Coletaram-se 74 amostras. As amostras foram obtidas de maneira aleatória de acordo com a rotina do abatedouro.

A obtenção do sangue realizou-se durante o processo de sangria dos suínos nos abatedouros, seguindo-se a recomendação da Instrução Normativa n.º3/2000 (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA). A sangria ocorreu posteriormente ao período de descanso e insensibilização, pelo método da eletronarcose, com os animais suspensos verticalmente. O sangue foi coletado com o auxílio de um copo descartável de plástico (150 ml), sendo imediatamente transferido para um tubo vacutainer (6 ml) específico para coagulação com identificação da amostra. Após a coleta, os tubos foram acondicionados em uma caixa de isopor isotérmica e encaminhados ao Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal no Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Permaneceram em descanso por doze horas em temperatura ambiente para a separação do soro e do coágulo. Após esse período, o soro das amostras foram transferidos para tubos de polipropileno devidamente identificados, sendo em seguida acondicionados sob temperatura de -20°C. Posteriormente, as amostras de soro foram descongeladas e centrifugadas. Em seguida, os soros foram armazenados em temperatura de -20°C para análises posteriores.

Análise sorológica

A análise sorológica realizou-se no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu. Foi aplicada a técnica de ELISA indireto com anticorpo de captura para a detecção de anticorpos contra o PCV2, segundo a metodologia desenvolvida por Cruz (2010).

As microplacas utilizadas para o ELISA foram de 96 cavidades de fundo chato, da marca Nunc (Maxisorp – certificadas). Para a diluição dos soros, teste e soro/plasma de referência negativa e positiva foram realizados em microplacas rígidas de fundo em “U” previamente tratadas. Inicialmente houve a etapa de adsorção da IgG na microplaca de ELISA e paralelamente os soros teste e soros/plasma de referência foram tratados na microplaca de fundo em “U”. Após a adsorção do anticorpo de captura, realizou-se a etapa de bloqueio de “ruídos”. Em seguida, o antígeno PCV2 e o controle sem antígeno foram diluídos e tratados após cinco lavagens com PBST, procedeu-se a transferência dos soros teste e soro/plasma de referência para a microplaca de ELISA. Em cada microplaca, os soro/plasmas de referência negativa e positiva também foram testados em duplicatas contra o antígeno PCV2 e controle sem antígeno (PBST). O conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma) foi preparado na diluição 1:5000 com PBST e 10% de LPD. Depois, a microplaca foi lavada e a solução do substrato enzimático (2,5 µL de H₂O₂ a 30%) com o cromógeno (100 µL do TMB a 10 mg/mL em DMSO) foi diluída em 10 mL do Tampão Citrato/Acetato 0,1 mol/L pH 6,0. A microplaca foi mantida sob agitação constante por quinze minutos em TA. A reação colorimétrica foi bloqueada com a solução de HCl 2M no volume de 50 µL/cavidade, e a leitura das D.O. realizou-se em um comprimento de onda de 450 nm (Multiskan EX – Labsystems) contra um branco onde foi colocado apenas o substrato e o bloqueador da reação colorimétrica.

O índice ELISA (IE) foi calculado para cada soro teste, após a subtração da média da D.O. encontrada para o controle sem antígeno (PBST) da média da D.O. obtida para o antígeno PCV2. Sua interpretação foi realizada de acordo com o Quadro 1; consideraram-se positivas as amostras que tiveram o $IE \geq 0,2$ (baixo, moderado e alto). Para as duplicatas dos soros teste, consideraram-se satisfatórias aquelas que apresentavam um desvio-padrão menor que 0,2. Assim, a seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo do IE:

$$IE = X - A/B - A$$

X = média das D.O. obtidas de cada soro teste após a subtração da média da D.O. do controle sem antígeno da média da D.O. do antígeno PCV2.

A = média das D.O. obtidas do soro/plasma de referência negativa.

B = média das D.O. obtidas do soro/plasma de referência positiva.

Quadro 1. Valores para interpretação do Índice ELISA

Valor IE	Interpretação I	Interpretação II
< 0,2	Baixíssimo nível de anticorpos	Não protetor
0,2 a < 0,5	Nível de anticorpos baixo	Baixa proteção
0,5 a < 0,8	Nível de anticorpos moderado	Boa proteção
> 0,8	Nível de anticorpos alto	Ótima proteção

Fonte: Cruz (2010).

Análise estatística

Realizou-se uma análise descritiva dos dados do Índice ELISA. Para cada categoria (baixíssimo, baixo, moderado e alto), foi calculada a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, além de terem sido construídos intervalos para 95% de confiança.

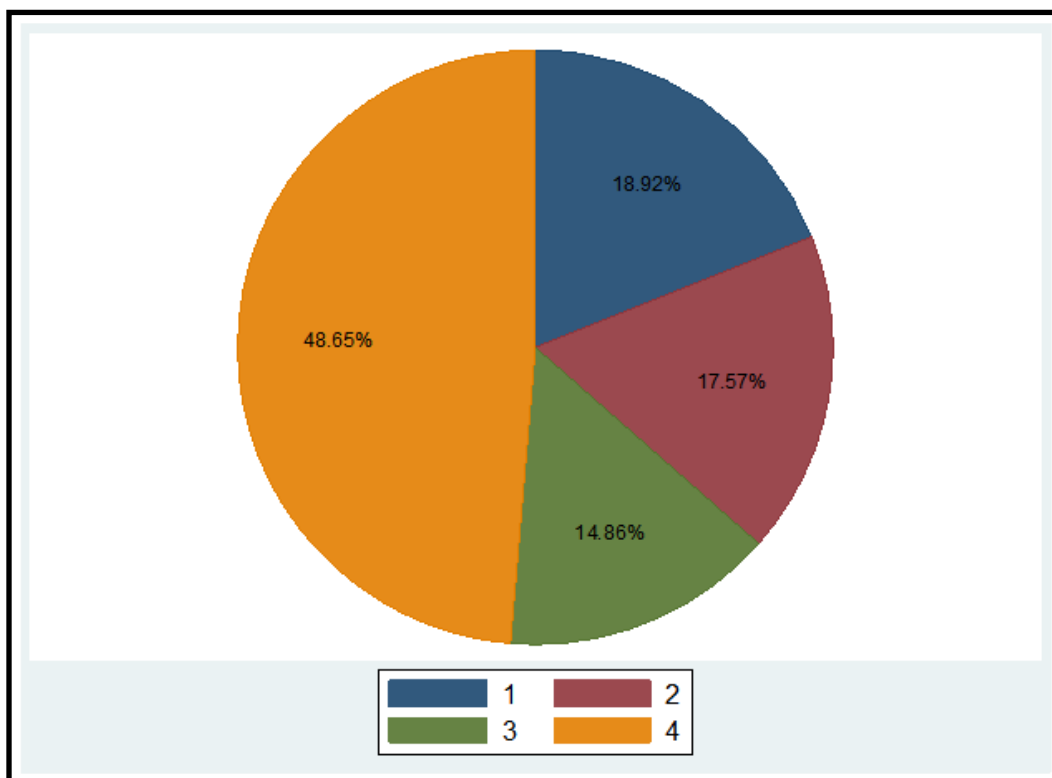
RESULTADOS

Os resultados das 74 amostras de soro estão apresentados na tabela de frequência com os respectivos intervalos de confiança para predição das frequências populacionais (Tabela 1). O Gráfico 1 oferece uma ideia esquemática da frequência relativa quanto às categorias no estudo.

Dentre as 14 amostras com IE considerada baixíssima (< 0,2), os resultados variaram entre 0,01 até 0,19; nas 13 com IE baixo (0,2 a < 0,5), a variação foi entre 0,21 a 0,45; nas 11 consideradas moderada (0,5 a < 0,8); os IE variaram de 0,58 a 0,76, e dentro das 36 amostras com IE consideradas alta (> 0,8), os IE estiveram entre 0,81 a 1,04.

Tabela 1. Frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança dos índices ELISA obtidos

Classificação	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Intervalo de confiança (95%)
(1) Baixíssimo	14	18.92	10.75 - 29.70
(2) Baixo	13	17.57	9.69 - 28.16
(3) Moderado	11	14.86	7.66 - 25.04
(4) Alto	36	48.65	36.85 - 60.56

Gráfico 1. Distribuição da frequência relativa dos índices ELISA com anticorpo de captura para detecção de anticorpos contra o *Circovírus suíno- 2* por categoria (1- baixíssimo, 2 – baixo, 3 – moderado e 4 – alto)

Também foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, além da construção dos intervalos para 95% de confiança (Tabela 2). Observou-se que a categoria que apresentou maior coeficiente de variação foi a baixíssima (0,766), diminuindo gradativamente até a categoria alto.

Tabela 2. Média, desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança para os Índices ELISA

Classificação	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação	Intervalo de confiança (95%)
(1) Baixíssimo	0.090	0.018	0.766	0.050 - 0.130
(2) Baixo	0.324	0.021	0.240	0.277 - 0.371
(3) Moderado	0.681	0.022	0.107	0.632 - 0.731
(4) Alto	0.927	0.009	0.063	0.907 - 0.947

O Gráfico 2 (*boxplot*) permite uma visualização da distribuição dos dados por categoria. O Gráfico 3 permite uma visualização da distribuição dos dados de maneira geral. A maior quantidade de espécimes com IE altos torna a curva levemente desviada à esquerda (assimetria negativa), tornando o valor da mediana maior do que o valor da média.

Gráfico 2. Boxplot dos Índices ELISA por categoria. O grupo baixíssimo (grupo 1) é o que apresenta maior distribuição dos dados, sendo a maioria deles próximos ao valor do limite superior

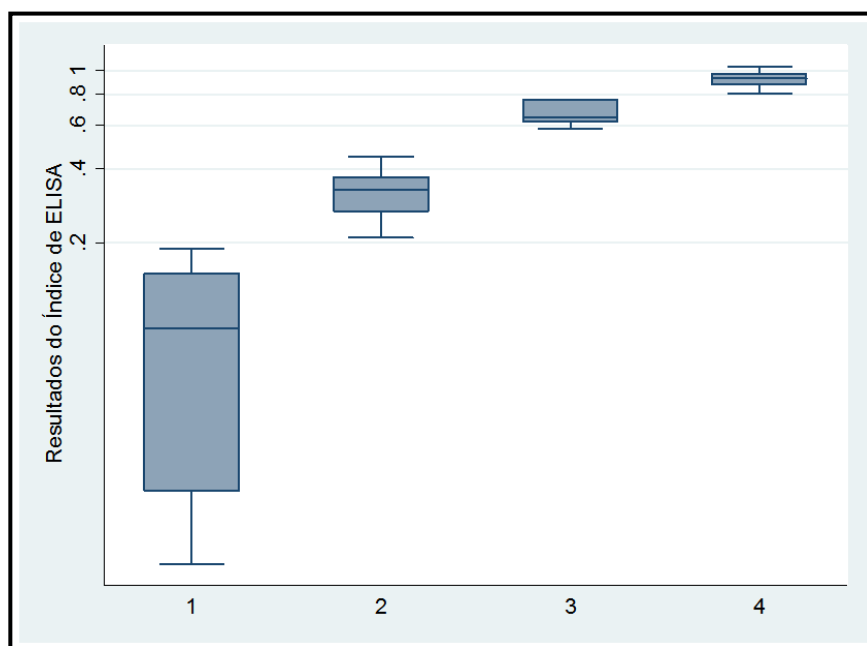
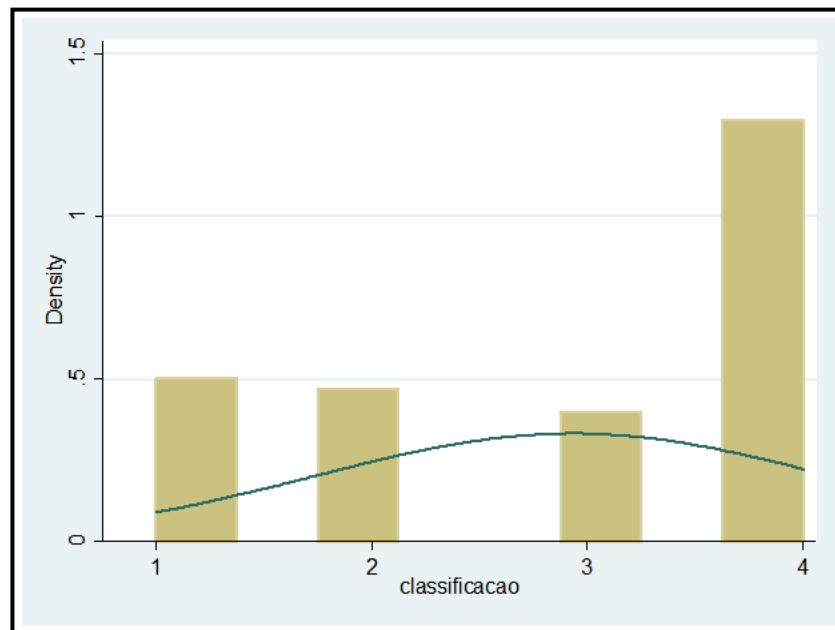


Gráfico 3. Pode-se observar no histograma uma distribuição platicúrtica dos dados e assimetria negativa



DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliaram-se 74 amostras, e dessas foram reativas 60 (81,08%), apresentando o IE dentre baixo, moderado a alto. Os resultados mostram uma alta ocorrência de anticorpos contra o PCV2 na área estudada, sugerindo a presença do vírus na região. Esses achados têm coerência com outras pesquisas que envolvem estudos sorológicos com o ELISA. Walker et al. (2000) realizaram um estudo retrospectivo (dos anos de 1973, 1981, 1984, 1988 e 1999) de amostras de soros de suínos oriundas de rebanhos comerciais e encontraram uma soroprevalência de 69,1% (1973), 61,3% (1981), 55% (1984), 100% (1988) e 92,1% (1999), com uma soroprevalência total de 77,2%.

Na França, Blanchard et al. (2003) pesquisaram amostras de soro de leitões e encontraram uma soroprevalência de 93%, em granjas com sinais clínicos de SDMS. Pozzi et al. (2008) detectaram a presença de anticorpos anti-PCV-2 em 100% dos rebanhos pesquisados. Resultados com porcentagens menores foram encontradas por Blanchard et al. (2003) pesquisando amostras de leitões de granjas sem doenças associadas ao PCV, que foi de 54%, e por Yang et al. (2008), que avaliaram 1.250 amostras de soro, colhidas aleatoriamente, encontrando reatividade em 500 amostras (40%).

Utilizando outras técnicas (IPMA e IFI), pesquisadores obtiveram resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho. No Canadá, Dulac e Afshar (1989) verificaram anticorpos contra o PCV em cerca de 80% da população de suínos estudada. Na Nova Zelândia, Horner (1991) investigou 30 amostras pela técnica de IFI e encontrou positividade em 22 delas. Na Inglaterra, Edwards e Sands (1994) encontraram anticorpos anti-PCV em 86% das amostras e em 100% dos rebanhos pesquisados. Hines e Lukert (1995) investigaram a prevalência do PCV em três estados dos Estados Unidos por meio da técnica de IFI e encontraram amostras reativas em mais de 50% nos locais pesquisados. Tischer et al. (1995) encontraram anticorpos anti-PCV em 75% de amostras de soro de suínos oriundas de abatedouros. Na Irlanda, Allan (1996) verificou uma prevalência de 92% de positividade nas amostras estudadas. Mesu et al. (2000) realizaram um estudo sorológico retrospectivo de amostras de matrizes jovens e leitões oriundas de 1985 a 1996 na Bélgica. Os autores pesquisaram anticorpos anti-PCV1 e anti-PCV2 e encontraram uma prevalência de 95% e 100%, respectivamente, nas fazendas onde trabalharam. Magar, Müller, Larochele (2000), no Canadá, estudaram anticorpos anti-PCV-1 e anti-PCV-2 em amostras provenientes dos anos de 1985, 1989 e 1997, pela técnica da IFI, e chegaram à conclusão de que o PCV-2 já estava presente no país havia, no mínimo, dez anos antes de ser descoberto, e Larochele, Magar e D'Allaire (2003) detectaram anticorpos anti-PCV2 pela técnica da IFI em 100% das amostras. Na Espanha Rodriguez-Arrijoja et al. (2003) estudaram amostras de suínos de 1983 a 1997 pela técnica da IPMA e encontraram anticorpos em mais de 70% das amostras pesquisadas.

No Brasil, Barbosa et al. (2008) utilizaram a técnica de IPMA em amostras provenientes de oito granjas dos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e encontraram reação em mais de 95% das amostras testadas. Gerber et al. (2009) realizaram um estudo sorológico em sete fazendas de ciclo único e quatro fazendas com ciclos produtivos especializados, com ou sem a SDMS. Em cada granja, coletaram-se 30 amostras de sangue para cada categoria do ciclo de produção: matrizes, leitões em amamentação, creche, cria e terminação. Os soros foram avaliados pela IPMA. Perfis sorológicos para PCV2 foram diferentes entre fazendas. Barbosa et al. (2011) investigaram a presença de anticorpos anti-PCV2 pela IPMA em 955 amostras de soros de suínos sem sintomatologia clínica de SMDS oriundas de 35 granjas comerciais de ciclo completo no estado de Minas Gerais. Das amostras pesquisadas, com 96,6% das amostras reagentes e 100% rebanhos apresentaram animais positivos.

A mensuração da acurácia da técnica do ELISA diante do IPMA e da IFI também é importante para a validação da técnica (WALKER et al., 2000; CRUZ, 2010; PILERI, 2014).

Realizaram-se pesquisas em torno dessa comparação. Walker et al. (2000) utilizaram 484 amostras de soros de suínos oriundas do Reino Unido, Canadá, França e Estados Unidos, e compararam o ELISA com a IFI. A sensibilidade e especificidade do ELISA foram de 99,58% e 97,14%, respectivamente. Blanchard et al. (2003) desenvolveram um ELISA indireto e compararam a sensibilidade e a especificidade do teste com a técnica de IPMA, utilizando 322 amostras de soros de suínos de provenientes de granjas da França. A sensibilidade foi de 98,2% e a especificidade de 94,5%. Shang et al. (2008) desenvolveram um ELISA indireto usando uma proteína do capsídeo do PCV2, expressa por meio da *Escherichia coli* (PAC ELISA). Esse ensaio foi comparado com a IFI e um ELISA baseado em PCV2 (ELISA PCV2). A sensibilidade de diagnóstico, especificidade e precisão da PAC ELISA foram respectivamente 95,3%, 93,9% e 95,1%, em comparação com IFI em 1.080 amostras de soro e 93,3%, 84,2% e 91,1%, em comparação com o ELISA PCV2 em 79 amostras de soros. Os autores concluíram que o PAC ELISA é mais prático, tem menor custo e é mais adequado para levantamentos em larga escala e avaliação de testes vacinais. Sun et al. (2010) desenvolveram um ELISA indireto usando um domínio antigênico codificado pela ORF2, expresso pela *Escherichia coli*. O ELISA foi realizado em 288 amostras de soro colhidas em diferentes rebanhos e comparados com um ensaio de IFI. No total, foram positivas 262 das 288 amostras, como indicado por ambos ELISA e IFI. A especificidade e sensibilidade do teste do ELISA desenvolvido foi de 87,7% e 93,57% respectivamente. Pileri et al. (2014) compararam a IPMA com três testes comerciais de ELISA (E1, E2 e E3), utilizando 1.270 amostras. Em comparação com IPMA, o teste E2 teve a maior sensibilidade (93,0%), seguido pelo E3 (90,1%) e E1 (85,0%), a especificidade foi de 100% para todos os testes. Os autores ainda ressaltaram que todos os três testes de ELISA tinham valores preditivos semelhantes ao do IPMA e podem ser utilizados para monitorar respostas de anticorpos contra infecção de PCV2 e/ou vacinação

No presente estudo, apenas a técnica do ELISA foi utilizada, mas como forma de comparação, pode-se utilizar um estudo realizado por Barbosa et al. (2010) no qual foi pesquisada a presença de anticorpos contra o PCV2 pela técnica da IPMA em 353 amostras de soros de suínos oriundos de cinco estados da região Nordeste do Brasil (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte). O resultado encontrado foi de 86,7% (306/353) de reatividade das amostras, e se forem observadas, em particular, as 67 amostras do estado de Pernambuco, percebe-se reatividade em 83,4% (56/67), ou seja, os resultados verificados pelos autores, tanto na região Nordeste, como no estado de Pernambuco são semelhantes ao encontrado na presente pesquisa.

Concluiu-se que a alta ocorrência de anticorpos contra o PCV2 encontrado nas amostras pesquisadas sugere que o vírus está circulante em rebanhos de suínos do estado de Pernambuco. Este estudo traz argumentos que justificam a aplicação da técnica do ELISA indireto com anticorpo de captura em pesquisas sorológicas envolvendo o PCV2 e, ainda, a necessidade de mais estudos com enfoque na prevalência do vírus em rebanhos suínos do estado de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Taís Fukuta da Cruz e ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, toda a ajuda para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, responsável pelo LEMTE (DG/UFPE). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço o financiamento da bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. M. Porcine Circovírus: epidemiology and pathogenesis. **Pig Journal**, v. 37, p.14-19, 1996.
- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 3-14, 2000.
- BARBOSA, C. N. et al. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.4, p.815-820, 2008.
- _____ et al. Serological survey on porcine circovirus type 2 (PCV2) in commercial swine farms located in the Northeastern States of Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 21., 2010, Vancouver, Canadá. **Anais... Vancouver: IPVS**, 2010. p. 336.
- _____ et al. Pesquisa de antígenos e anticorpos contra Circovírus suíno II em suínos com e sem sintomatologia da síndrome multisistêmica do definhamento em granjas comerciais mineiras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1513-1526, 2011.
- BLANCHARD, P. et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 3, p.183-194, 2003.

CARRIJO, K. de F. **Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovírus suíno tipo 2 em tecidos pulmonar, renal e linfóide e de *Leptospira spp.* em suínos abatidos sob inspeção sanitária.** 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2012.

CASTRO, A. M. M. G. et al. Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 281-291, 2007.

CIACCI-ZANELLA, J. R. *Circoviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, 2007. cap. 13, p. 361-374.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, P.EIP16.

CRUZ, T. F. da. **Padronização e aplicação da técnica de ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) indireto com anticorpo de captura para a detecção de anticorpos contra o circovírus suíno tipo 2.** 2010. 87 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010.

DULAC, G.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC-CCL 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 431-433, 1989.

EDWARD, S.; SANDS, J. J. Evidence of circovírus infection in British pigs. **Veterinary Research**, v. 134, p. 680-681, 1994.

FERREIRA, A. S.; SILVA, F. C. de O. Suinocultura com foco na agricultura familiar. **Informe Agropecuário: tecnologias para a agricultura familiar: produção animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 256, p. 78-84, 2010.

GERBER, P. F. et al. Distribution of antibodies against porcine circovirus type-2 (PCV2) in single site and multi-site farrow-to-finish farms in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 3, p. 488–491, 2009.

HINES, R. K.; LUKERT, P. D. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. **Journal of the Swine Health and Production**, Ontário, v. 3, n. 2, p. 71-73, 1995.

HORNER, G. W. Pig antibodies presente in New Zeland pigs. **Surveillane**, v. 18, p. 32, 1991.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D’ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, n.67, p.114-120, 2003.

MAGAR, R.; MÜLLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 64, p. 184-186, 2000.

MESU, A. P. et al. Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 4, p. 234-236, 2000.

NAWAGITGUL, P. et al. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2002.

PILERI, E. et al. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 429-432, 2014

POZZI, S. P. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection of pigs in Israel: clinical presentation, diagnosis and virus identification. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 63, n. 4, p. 122-125, 2008.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M. et al. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, n. 50, p. 99-101, 2003.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, p. 10-19, 2012.

SHANG, S. B. et al. Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2. **Research Veterinary Science**, v. 84, n. 1, p. 150-157, 2008.

SUN, S. et al. Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2. **Virology Journal**, v. 274, n. 7, p. 1-7, 2010.

TISCHER, I. et al. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of diferente breeding farms. **Archives of Virology**, v. 140, p. 737-743, 1995.

TODD, D. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 5, p. 373-394, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Centro Universitário de Estudos e Pesquisas sobre Desastres (CEPED). O estado de Pernambuco. In: _____. **Atlas brasileiro de desastres naturais: 1991 a 2012**. Volume Pernambuco. 2. ed. rev. amp. Florianópolis: Ceped, UFSC, 2013. p. 19-27.

WALKER, I. W. et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 400-405, 2000.

YANG, Z. et al. A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 2, p. 148-153, 2008.

4.2 Artigo 2

Detecção do DNA do *Circovírus Suíno* (PCV) no fluido oral de suínos pela técnica da PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Resumo: O *Circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*. O vírus subdivide-se em dois tipos, o *Circovírus suíno-1* e o *Circovírus suíno-2*, PCV1 e PCV2 respectivamente. O PCV2 está entre os patógenos de maior relevância sanitária na suinocultura. Várias doenças estão associadas a ele. A carga viral do PCV vem sendo relacionada com a severidade clínica das doenças. Esse cenário trouxe o desenvolvimento de técnicas quantitativas, como a Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Somado a esse aspecto, a suinocultura vem demandando cada vez mais opções de amostras biológicas que venham a substituir o sangue em razão do grande estresse que o processo da coleta de sangue causa nos animais. O fluido oral (FO) é uma amostra biológica que vem sendo bastante utilizada na suinocultura por diminuir o estresse e favorecer o bem-estar animal. Levando em conta essas informações, é proposto detectar a carga viral do PCV em amostras de FO de suínos pela técnica de qPCR. As coletas realizaram-se no Abatedouro Municipal da cidade de Paulista, localizado na Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco. Obtiveram-se as amostras de FO pela técnica da corda de algodão dos suínos que estavam alojados nas baias de descanso. Analisaram-se 60 amostras de FO. Do total de amostras estudadas, apresentaram o DNA do vírus 13,34% (8/60). Dessas 75% (6/8) apresentaram uma carga viral muito baixa (até 4 (log)/mL da amostra) e 25% (2/8) uma carga viral classificada como baixa (de 4 a 5 (log)/mL da amostra). Os resultados identificaram a presença do vírus em quantidades baixas nas amostras pesquisadas. O FO está ampliando as perspectivas em testes laboratoriais, monitoramento das infecções no rebanho e no cuidado do animal.

Palavras-chave: Carga viral, Diagnóstico, Fluido oral, Suíno.

A Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) for the detection of *Porcine circovirus* (PCV) DNA in swine oral fluid

Abstract: *Porcine Circovirus* (PCV) belongs to the *Circoviridae* family and *Circovirus* genus. The virus is subdivided into two types, *porcine circovirus-1* and *porcine circovirus-2*, PCV1 and PCV2, respectively. The PCV2 is among the pathogens that cause greatest concern to health in pig farming. Several diseases are linked to it. The viral load of PCV has been linked to the clinical severity of disease. This serious problem has led to quantitative techniques being employed, such as a Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). The aim of this study was to quantify the viral load of PCV by employing the qPCR technique in swine oral fluid (FO) samples. These samples were collected from the Municipal Slaughterhouse of the town of Paulista, located in the metropolitan district of Recife, Pernambuco State. The FO samples were obtained by the cotton rope technique used for pigs housed to rest in pens. 60 FO samples were analyzed. 13.34% (8/60) of the samples analyzed had PCV2 DNA. 75% of these (6/8) had a very low viral load (Up to 4 (log) / ml sample) and 25% (2/8) a viral load classified as low (4 to 5 (log) / ml of sample). The results showed the

presence of the virus at low levels in the studied samples. The FO samples can broaden the scope of laboratory testing, monitoring infection in herds and improving animal healthcare.

Keywords: Diagnosis. Oral fluid. Swine. Viral load.

INTRODUÇÃO

O *Circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*. O vírus subdivide-se em dois tipos, o *Circovírus suíno-1* e o *Circovírus suíno-2*, PCV1 e PCV2 respectivamente. O PCV1 não é patogênico, ao contrário do PCV2 (ALLAN; ELLIS, 2000; TODD, 2000; CIACCI-ZANELLA, 2007). O PCV2 está entre os patógenos de maior relevância sanitária na suinocultura. Várias doenças estão associadas a esse vírus, sendo denominadas de PCVD (do inglês *porcine circovirus diseases*). Essas podem ser classificadas nas categorias Infecção Subclínica, perdas produtivas sem a presença de sinais clínicos, e Infecção Clínica: doença sistêmica, associada à síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS); doenças respiratórias, associadas à pneumonia proliferativa e necrosante (PPN); doenças digestivas, associadas a enterites; doenças reprodutivas, causando falhas reprodutivas; e a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS) (SEGALÉS, 2012). A SMDS é a principal doença associada ao PCV2. Essa síndrome acomete os leitões nas fases de creche e de crescimento e tem como principais sinais clínicos a caquexia, linfadenopatia, dispneia, diarreia, icterícia e palidez das mucosas (CRUZ, 2010; BARBOSA et al., 2011).

O PCV é um vírus, com diâmetro de 15 a 17 nm, de simetria icosaédrica, não envelopado. Seu DNA é de fita simples com forma circular, covalentemente fechado, com senso positivo, tendo peso molecular de $0,56 \times 10^6$ Daltons e tem genoma com 1.760 nucleotídeos. As principais regiões de leitura aberta (ORF do inglês *Open Reading Frame*) do PCV são a ORF-1 e ORF-2. Por meio da ORF-1, são produzidas duas proteínas com envolvimento na replicação viral, a Rep e Rep'. A ORF-1 é conservada entre o PCV1 e PCV2, apresentando similaridade de 83% na sequência dos nucleotídeos e 86% na sequência de aminoácidos. A ORF-2 codifica uma proteína envolvida na formação do capsídeo viral, com grande potencial para ser utilizada na detecção do PCV2 (ALLAN; ELLIS, 2000; CASTRO et al., 2007; CIACCI-ZANELLA, 2007; CRUZ, 2010). A ORF-3 no PCV2 representa uma área de codificação de uma proteína não estrutural com função ligada com a apoptose (LIU et al., 2006; FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2009), e mais recentemente, a ORF-4, que tem função na replicação viral e patogenicidade (GAO et al., 2013). Além dessas, existem outras ORFs (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) (CASTRO et al., 2007).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é considerada uma importante ferramenta laboratorial para a identificação do PCV. Novas variações do PCR vêm aumentando a sensibilidade e especificidade da técnica, como a Multiplex – PCR (LAROCHELLE et al., 1999), Nested-PCR (NPCR) (KIM et al., 2001) e NPCR em Único Tubo (STNPCR) (PONTES et al., 2014). Pelo fato de a carga viral do PCV está sendo relacionada com a severidade clínica das doenças associadas ao vírus, técnicas quantitativas, como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), estão sendo cada vez mais utilizadas. Essa ferramenta mostra-se mais prática, mais sensível, mais segura contra contaminação e mais confiável que a técnica convencional, podendo auxiliar no diagnóstico e no estudo da dinâmica da doença *in vivo*, como também em monitorias sanitárias de rebanhos (OLVERA et al., 2004; CRUZ, 2006; MCINTOSH et al., 2009; SEGALÉS, 2012; LI, KAWASHIMA.; KATSUDA., 2016).

Diversas amostras biológicas vêm sendo utilizadas em estudos moleculares, sangue total, soro, secreção nasal, fezes, sêmen, tecidos (pulmão, baço, nódulos linfáticos, fígado, dentre outros) e o fluido oral (FO) (CIACCI-ZANELLA et al., 2006; YANG et al., 2008; CRUZ, 2010; PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010; PONTES et al., 2014). O FO é o termo utilizado para nomear o líquido incolor e viscoso presente na cavidade oral dos seres humanos e dos animais. Trata-se de uma mistura complexa, que contém saliva e outros fluidos provenientes dos capilares sanguíneos presentes na mucosa oral e tecido gengival. O FO vem sendo utilizado em diversas áreas da Saúde, apresentando-se como uma técnica não invasiva, segura, prática e de baixo custo (HODINKA; NAGASHUNMUGAM; MALAMUD, 1998; KAUFMAN; LAMSTER, 2002; DELIMA; VAN DIKE, 2003; PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010; BADIYANI, KUMAR; MARU, 2013).

Na Medicina Veterinária, a utilização do FO propicia uma diminuição do estresse provocado pela coleta do sangue, favorecendo o bem-estar animal. Trata-se de um procedimento simples, não invasivo e de baixo custo (ZIMMERMAN, 2012; BARBOSA et al., 2013; SCHAEFER et al., 2013). Situações essas favoreceram o processo de obtenção das amostras e justificam estudos de padronização e viabilidade do FO como amostra biológica em testes laboratoriais. Partindo desses aspectos, objetivou-se detectar a carga viral do PCV em amostras de FO de suínos por meio da técnica de qPCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da área estudada

O estado de Pernambuco situa-se na parte centro-leste da região Nordeste do Brasil, ocupando uma área de 98.281 km², limitando-se ao norte com os estados da Paraíba e do Ceará, a leste com o Oceano Atlântico, ao sul com os estados de Alagoas e Bahia e a oeste com o estado do Piauí. Pernambuco divide-se em quatro regiões: a Região Metropolitana do Recife (RMR), que envolve a capital e cidades vizinhas, a Zona da Mata, mais próxima do litoral, o Agreste, área de transição para a região semiárida do estado e o Sertão, onde predomina o clima semiárido e o bioma da caatinga (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2013).

As coletas realizaram-se no Abatedouro Municipal da cidade de Paulista, localizado no bairro de Artur Lundgren II, na RMR, no período de junho a novembro de 2014.

Obtenção das amostras de fluido oral

As amostras de FO foram obtidas de suínos mestiços no abatedouro e seguiu-se a metodologia descrita por Barbosa et al. (2013). As cordas foram posicionadas pelo operador dentro das baias coletivas, próximas dos animais na altura do dorso. Após o período de mastigação de cinco minutos, a recuperação da amostra foi feita da seguinte forma: as cordas umedecidas pelo FO foram colocadas individualmente em sacos plásticos, sendo o líquido extraído por compressão da extremidade úmida da corda dentro do próprio saco plástico. A parte inferior do canto do saco plástico foi cortada, com auxílio de uma tesoura, e o FO drenado para o tubo de polipropileno. As amostras foram devidamente identificadas com canetas pilotos, acondicionadas em uma caixa isotérmica de isopor e encaminhadas ao laboratório para análises posteriores.

Procedimentos laboratoriais

As etapas de identificação das amostras e de extração do DNA realizaram-se no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapias Experimentais (LEMTE), Departamento de Genética, da Universidade Federal de Pernambuco (DG/UFPE). A execução das reações de

qPCR realizaram-se no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp/Botucatu).

Identificação das amostras de Fluido Oral

As amostras foram identificadas por letras alfabéticas (B até H), correspondendo à data em que foram coletadas, seguidas do número referente à ordem da obtenção da amostra no momento da coleta no abatedouro.

Preparação das amostras

As amostras foram clarificadas por centrifugação a 5.000 rpm por dez minutos e estocadas em alíquotas de 1 mL à temperatura de -20°C até a realização das análises.

Extração do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o Kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin GE healthcare – código 28-9042-65, 250 preparações (Figura 1). Seguiram-se as recomendações do fabricante. O volume usado de cada amostra foi de 300 µL e o DNA extraído foi diluído com 30 µL de solução tampão. O DNA genômico foi mantido à temperatura de -20°C.

Figura 1. Kit comercial GE health care usado para a Extração do DNA genômico das amostras de fluido oral



Análise molecular

Para as análises das 60 amostras de FO, aplicou-se a técnica de qPCR segundo a metodologia descrita por Cruz (2010). Resumidamente, a técnica realizou-se utilizando os *primers* descritos por Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002), que amplificam um produto de 152 pares de bases (pb) da região da ORF1, conservada tanto no PCV1 como no PCV2. As reações foram preparadas para um volume total de 10 μ L, contendo 0,2 μ M de cada *primer* e 1X Go Taq® qPCR Master Mix (Promega) e 2,0 μ L da amostra, conforme instruções do fabricante. As condições da reação foram de 95°C por dois minutos, 40 ciclos de 95°C por quinze segundos e 60°C por sessenta segundos, seguidos de uma curva de dissociação de 95°C a 60°C. A concentração de DNA nas amostras analisadas realizou-se pela determinação de uma curva padrão com sete pontos, construída com um plasmídeo padrão de PCV diluído de 10^7 a 10^1 cópias de DNA/ μ L em duplicata. Os resultados foram expressos em números de cópias de DNA de PCV/ml de amostra e também transformados em \log_{10} . Como controle negativo, utilizou-se água ultraestéril.

Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados, adotaram-se os seguintes parâmetros conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros para a interpretação dos resultados da PCR quantitativa em Tempo Real para detecção do DNA do *Circovírus suíno* nas amostras de fluido oral

Valores (log)/ mL de amostra	Interpretação
Negativo	Indetectável: PCV pode estar presente, mas não em viremia
Até 4	Carga viral muito baixa: não há comprometimento do sistema Imune
De 4 a 5	Carga viral baixa: pode haver imunossupressão e perdas zootécnicas leves
De 5 a 6	Carga viral média: pode haver comprometimento do sistema imune com perdas zootécnicas consideráveis
De 6 a 7	Carga viral alta: imunossupressão alta e aparecimento das doenças associadas
Acima de 7	Imunossupressão grave e doença associada à alta mortalidade.

Análise estatística

Empregou-se uma análise descritiva das frequências absoluta e relativa por meio dos resultados obtidos pela análise molecular (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

Das 60 amostras de FO analisadas, oito (13,34%) apresentaram DNA do PCV com valores (log/ml) que variaram de até 4 e de 4 a 5. Os detalhes podem ser verificados no Quadro 2.

Quadro 2. Resultados das reações da PCR quantitativa em tempo real para detecção do *Circovírus suíno* em 60 amostras de fluido oral de suínos

	Amostra	Quantidades de cópias/ml	Log		Amostra	Quantidades de cópias/ml	Log
1	B1	Negativo	Negativo	31	E12	Negativo	Negativo
2	B2	Negativo	Negativo	32	F1	Negativo	Negativo
3	B3	Negativo	Negativo	33	F2	Negativo	Negativo
4	B4	Negativo	Negativo	34	F3	Negativo	Negativo
5	B5	Negativo	Negativo	35	F4	Negativo	Negativo
6	B6	Negativo	Negativo	36	F5	Negativo	Negativo
7	B7	Negativo	Negativo	37	F6	Negativo	Negativo
8	B8	Negativo	Negativo	38	F7	Negativo	Negativo
9	B11	Negativo	Negativo	39	F8	Negativo	Negativo
10	C1	Negativo	Negativo	40	G1	Negativo	Negativo
11	C2	Negativo	Negativo	41	G2	Negativo	Negativo
12	C3	Negativo	Negativo	42	G3	Negativo	Negativo
13	C4	Negativo	Negativo	43	G4	Negativo	Negativo
14	C5	Negativo	Negativo	44	G5	Negativo	Negativo
15	C6	Negativo	Negativo	45	G6	Negativo	Negativo
16	C7	Negativo	Negativo	46	G7	Negativo	Negativo
17	C8	Negativo	Negativo	47	G8	Negativo	Negativo
18	D1	Negativo	Negativo	48	G9	Negativo	Negativo
19	D2	Negativo	Negativo	49	G10	Negativo	Negativo
20	E1	Negativo	Negativo	50	G11	Negativo	Negativo
21	E2	Negativo	Negativo	51	H1	2970	3,47
22	E3	Negativo	Negativo	52	H2	2009	3,30
23	E4	Negativo	Negativo	53	H3	Negativo	Negativo
24	E5	Negativo	Negativo	54	H4	1556	3,19
25	E6	Negativo	Negativo	55	H6	12764	4,11
26	E7	Negativo	Negativo	56	H7	4279	3,63
27	E8	Negativo	Negativo	57	H8	Negativo	Negativo
28	E9	Negativo	Negativo	58	H9	8346	3,92
29	E10	Negativo	Negativo	59	H10	6984	3,84
30	E11	Negativo	Negativo	60	H11	13013	4,11

Das oito amostras positivas, seis (75%) apresentaram valores (log/mL) de até 4, representando uma carga viral muito baixa, e somente em duas (25%) amostras observaram-se valores de 4 a 5 que é classificado com uma carga viral baixa (Quadro 3).

Quadro 3. Amostras de fluido oral positivas para o *Circovírus suíno* e as respectivas interpretações

Identificação das amostras	Log/ml	Interpretação
H1	3,47	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H2	3,30	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H4	3,19	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H6	4,11	De 4 a 5: Carga viral baixa pode haver imunossupressão e predas zootécnicas leves
H7	3,63	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H9	3,92	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H10	3,84	Até 4: Carga viral muito baixa, não há comprometimento do sistema imune
H11	4,11	De 4 a 5: Carga viral baixa pode haver imunossupressão e predas zootécnicas leves

DISCUSSÃO

No sistema de produção de suínos, o procedimento de coleta de sangue é muito laborioso e estressante para o animal. Avaliar novas amostras biológicas que venham a facilitar esse processo, aliadas à viabilização de técnicas laboratoriais mais eficazes para a detecção do PCV, é fundamental para auxiliar no diagnóstico da SDMS.

Prickett e Zimmerman (2010) relataram que os estudos realizados com o FO na Medicina Veterinária têm como principal objetivo a investigação de patógenos e anticorpos associados às doenças infecciosas. Dentre os agentes pesquisados em amostras de FO de suínos, temos o vírus da estomatite vesicular (VSV) (STALLKNECHT et al., 1999), vírus da febre aftosa (EBLÉ et al., 2004), PRRSV (PRICKETT et al., 2008), vírus da influenza A (DETMER et al., 2011; SCHAEFER et al., 2013), PCV2 (PRICKETT et al., 2011), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Haemophilus parasuis* (HP) e *Streptococcus suis* (SS) (COSTA, OLIVEIRA; TORRISON, 2012) e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2013).

A técnica da qPCR desenvolvida neste trabalho foi a do sistema TaqMan, similar à técnica utilizada por Olvera et al. (2004) e Segalés, Allan e Domingo (2005). Outros trabalhos desenvolveram a qPCR pelo sistema SYBR Green (CRUZ, 2006, 2010; MCINTOSH et al., 2008, 2009). Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados para uma região conservada nos dois tipos de PCV (PCV1 e PCV2), a ORF-1, evitando o risco de falso-negativo em razão das variações dos genótipos e as possíveis mutações que o vírus possa sofrer. Técnicas semelhantes foram utilizadas nos trabalhos de Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002) e Cruz (2006, 2010). Outros autores desenvolveram seus trabalhos utilizando *primers* desenhados para a ORF-2 específica do PCV2 (OLVERA et al., 2004; MCINTOSH et al., 2008, 2009).

Os resultados encontrados neste estudo revelaram a presença do PCV em 13,34 % (8/60) das amostras pesquisadas, podendo ser considerada uma baixa ocorrência se comparar com outros estudos moleculares. Yang et al. (2008) verificaram a presença do PCV2 em 83% (165/200) das amostras de tecidos (fígado, baço e nódulos linfáticos) utilizando a PCR convencional, enquanto Pontes et al. (2014), utilizando a STNPCR, encontraram 100% (55/55) de PCV2 em amostras de tecidos (nódulos linfáticos e pulmão) e Briani et al. (2015) encontraram o PCV2 em 87,5% (16/14) de amostras de fezes.

Alguns pesquisadores correlacionaram com a severidade dos sinais clínicos das doenças associadas ao PCV2 com a carga viral. Olvera et al. (2004) pesquisaram pela técnica da qPCR 75 amostras de soros de suínos, que foram necropsiados com lesões histológicas no sistema linfático, classificadas como branda (n=27), moderada (n=24) e severa (n=24), e verificaram uma relação proporcional da carga viral com a gravidade das lesões. LI et al. (2016) verificaram em 30 amostras de tecidos de suínos com SDMS por meio de exames histopatológicos e de qPCR que, quanto mais severa a lesão nos tecidos linfáticos, maior a carga viral. Neste estudo foi investigada a presença do DNA do PCV no FO de suínos clinicamente saudáveis. Esses estudos podem sugerir o motivo das oito amostras positivas encontradas, 75% (6/8), estarem com uma carga viral muito baixa e 25% (2/8) estarem com uma carga viral considerada baixa.

McIntosh et al. (2008) avaliaram a carga viral de rebanhos comerciais com e sem doenças associadas ao PCV utilizando a qPCR em amostras de fezes. Os resultados revelaram que a média da carga viral encontrada foi maior nos rebanhos com doenças associadas ao PCV do que os sem doenças associadas ao PCV, nos estágios produtivos mais jovens (leitões em amamentação, cria e recria), e o contrário ocorreu nos estágios produtivos mais tardios (terminação e matrizes a partir dos seis meses), no qual a média da carga viral do PCV2

encontrada foi maior nos rebanhos sem doenças associadas ao PCV do que nos rebanhos com doença associada ao vírus.

Os resultados evidenciaram a presença do DNA do PCV no FO e tiveram as cargas virais mensuradas em muito baixa e baixa. A utilização do FO como amostra biológica está ampliando as perspectivas em testes laboratoriais, monitoramento das infecções no rebanho e no cuidado do animal.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Taís Fukuta da Cruz e ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, toda a ajuda para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, responsável pelo LEMTE (DG/UFPE). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), agradeço o financiamento da bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 3-14, 2000.

BADIYANI, B.; KUMAR, A.; MARU, V. P. Role of Saliva in Dental Practice: a review. **Journal of Dental Sciences**, v. 1, n. 1, p 1-6, 2013.

BARBOSA, C. N. et al. Pesquisa de antígenos e anticorpos contra circovírus suíno II em suínos com e sem sintomatologia da síndrome multisistêmica do definhamento em granjas comerciais mineiras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1513-1526, 2011.

BARBOSA, C. N. et al. Aplicação da metodologia de coleta do fluido oral em suínos mestiços. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 7, n. 3, p. 32-38, 2013.

BRIANI, A. B. et al. Detecção de circovírus suíno 2 (PCV2) por reação em cadeia pela Polimerase (PCR) nas fezes e baía de suínos em granja sem vacinação. **Atas de Saúde Ambiental** (online), São Paulo, v. 3, n. 2, p. 4-9, 2015.

CASTRO, A. M. M. G. et al. Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 281-291, 2007.

CIACCI-ZANELLA, J. R. et al. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p.1480-1485, 2006.

_____. Circoviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. cap. 13, p. 361-374.

COSTA, G.; OLIVEIRA, S.; TORRISON, J. Detection of actinobacillus pleuropneumoniae in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 20, n. 2, p. 78-81, 2012.

CRUZ, T. F. da. **Quantificação do circovírus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2006.

_____. **Padronização e aplicação da técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto com anticorpo de captura para a detecção de anticorpos contra o circovírus suíno tipo 2**. 2010. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010.

DELIMA, A. J.; VAN DYKE, T. E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology** 2000, v. 31, p. 55-76, 2003.

DETMER, S. E. et al. Detection of influenza A virus in porcine oral fluid samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 241-247, 2011.

EBLÉ, P. et al. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. **Vaccine**, v. 22, p. 1372-1378, 2004.

FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circovirus-small but powerful. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 177-183, 2009.

GAO, Z. et al. Identification and characterization of two novel transcription units of porcine Circovirus 2. **Virus Genes**, v. 47, p. 268-275, 2013.

GIMÉNEZ-LIROLA, L. G. et al. Improving ante mortem diagnosis of erysipelothrix rhusiopathiae infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid and antibodies detection. **Journal of Microbiological Methods**, v.92, p.113-121, 2013.

HODINKA, R. L. NAGASHUNMUGAM, T.; MALAMUD, D. Detection of Human Immunodeficiency Virus Antibodies in Oral Fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 4, p. 419-426, 1998.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, L. P. The diagnostic applications of saliva – a review. **Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197-212, 2002.

KIM, J. et al. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 98, p. 25-31, 2001.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S. et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 97-114, 2002.

LAROCHELLE, R. et al. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 1999.

LI, Y.; KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K. Correlation of viral load with lesion severity in field pigs affected with porcine circovirus type 2. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 3, p. 192-198, 2016.

LIU, J. et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal Virology**, v. 80, n. 10, p. 5065-5073, 2006.

MCINTOSH, K. A. et al. Quantitative polymerase chain reaction for porcine circovirus-2 in swine feces in a porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 1189-1194, 2008.

MCINTOSH, K. A. et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in sérum, buffy coat, feces and multiple tissues. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 23-33, 2009.

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, p. 75-80, 2004.

PONTES, N. E. et al. Development and evaluation of single-tube Nested PCR (STNPCR) for the detection of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 3, p. 233-238, 2014.

PRICKETT, J. R. et al. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. **Journal of Swine Health and Production**, v. 1, p. 86-91, 2008.

PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, p. 207-216, 2010.

PRICKETT, J. R. et al. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 2, p. 121-127, 2011.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SCHAEFER, R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 61-73, 2013.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, p.10-19, 2012.

_____; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.

STALLKNECHT, D. et al. Potential for contact and mechanical vector transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 43-48, 1999.

TODD, D. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 5, p.373-394, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Centro Universitário de Estudos e Pesquisas sobre Desastres (CEPED). O estado de Pernambuco. In: _____. **Atlas brasileiro de desastres naturais: 1991 a 2012. Volume Pernambuco. 2. ed. rev. amp.** Florianópolis: Ceped, UFSC, 2013. p. 19-27

YANG, Z. et al. A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 2, p. 148-153, 2008.

ZIMMERMAN, J. Monitorando doenças infecciosas em plantéis de suínos por meio de amostras de fluidos orais. **Suínos & CIA**, n. 44, p. 26-31, 2012.