

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Nayara Evaristo de Pontes

**Estudos Moleculares Aplicados ao Circovírus suíno tipo 2:
Desenvolvimento da técnica de *Nested*-PCR em tubo único
(STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco**

Recife

2014

Nayara Evaristo de Pontes

**Estudos Moleculares Aplicados ao Circovírus suíno tipo 2:
Desenvolvimento da técnica de *Nested*-PCR em tubo único
(STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Prof.^a Dra. Clara Nilce Barbosa

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Pontes, Nayara Evaristo de

Estudos moleculares aplicados ao circovírus suíno tipo 2: desenvolvimento da técnica de *Nested*-PCR em tubo único (STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco / Nayara Evaristo de Pontes. - Recife: O Autor, 2014.

66 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos Dias de Freitas

Coorientadora: Clara Nilce Barbosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Suíno- doenças 2. Circovírus 3. Genética molecular I. Freitas, Antonio Carlos Dias de (orientador) II. Barbosa, Clara Nilce (coorientadora) III. Título

571.99211

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 198

Nayara Evaristo de Pontes

**Estudos Moleculares Aplicados ao *Circovírus* suíno tipo 2:
Desenvolvimento da técnica de *Nested-PCR* em tubo único
(STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco**

Aprovado em 17/02/2014

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Carlos de Freitas

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Clara Nilce Barbosa

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Marcus Vinícius de Aragão Batista

Universidade Federal de Sergipe

Dra. Maria Angélica Ramos da Silva

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2014

Eu dedico este trabalho a Deus, pois sem ele não
teria conseguido concluir.

Até aqui nos ajudou o Senhor.

1 Samuel 7.12b

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por toda a inspiração, por guiar os meus passos e me ajudar nos momentos importantes, momentos de tristeza, de alegria, enfim em todos os momentos Deus está presente em minha vida, tenho uma grande comunhão com Deus, Deus meu melhor amigo.

Agradeço a meus pais, Iranete e Ronaldo, ao meu irmão Dawsley e ao meu noivo Itamar, por toda a paciência, amor e dedicação prestada, pelo apoio nos momentos difíceis, pela força nos momentos importantes, meus lindos e jovens pais, irmão e noivo agradeço por tudo, amo vocês demais.

Agradeço ao prof. Antonio Carlos por toda orientação, ajuda e paciência durante os seis anos como orientador, e a Prof.^a Clara por toda ajuda e orientação, durante os dois anos e meio como minha orientadora, obrigada por tudo, eu posso afirmar com orgulho que são meus queridos orientadores. Angélica, obrigada por tudo, por toda orientação e ajuda prestada me ajudando sempre. Obrigada por sempre me acompanhar desde o começo de tudo e enfim continuar sendo minha coorientadora.

Agradeço a minha família por todo o apoio e comemoração, obrigada pela alegria e união de sempre, em especial para Pedro, Kika, Voinho, Lígia, Neide, Sandra, Tainá, Tito, Yasmin, Carol, Alba, Antonio, Hero, Paulino, Leonardo, Bruno, Vanessa, Vovô, Paulinho, Luciene, Luan, Tio Paulo, Josy, Leo, Tia Cecinha, Biuzinho (meu vô de coração).

Agradeço ao meu líder espiritual, meu querido Pastor Edson Vando e sua família. E ao pastor Jefferson Santos e sua família.

Aos meus amigos em especial a Yasmin (prima), Cecília, Danubia, Tiago, Ludmylla, Alexandra, Carina, Rosimere, Daniela, Jucelito, Taciana, Caio, Adriano, Chico e Rafael pelo companheirismo, por me fazer rir muitas vezes, por fazer tudo parecer simples e ter solução, enfim, vocês moram no meu coração para sempre.

A todos os meus amigos e professores da Rural, minha turma LB1 a melhor de todas as turmas, amo todos. Agradeço por todo apoio, força e incentivo nos momentos decisivos da minha vida.

Agradeço a Evilis (coração) pela amizade e pela ajuda no estágio, obrigada amiga por tudo.

Aos meus amigos do laboratório LEMTE (Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental) André, Barbara, Kamylla, Karin, Billy, Jackeline, Janaine, Marcelo, Elyda (Gracinha), Eliane, Filipe, Carol, Pavla, Erinaldo, Luciana, pelo companheirismo e amizade, de fundamental importância durante minha graduação e mestrado, pelas incontáveis dúvidas e perguntas relacionadas à genética molecular, a PCR, a clonagem, em especial a André e Barbara, agradeço muito por tudo. Agradeço também a Cybelle (*in memoriam*) por tudo.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Genética, Henrique, Dona Zizi e Seu Romildo (o tricolor), que colaboraram para o andamento deste trabalho.

Agradeço a UFPE e ao Departamento de Genética pela recepção prestada todo esse tempo.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia Veterinária (MICROVET-MG), por gentilmente ceder à amostra positiva de *Circovírus* suíno e a EMBRAPA Suínos e Aves por ceder gentilmente os controles negativos de suínos, importantes para o andamento do projeto.

Agradeço ao CNPq e CAPES por todo apoio financeiro.

*“Confia no SENHOR de todo o teu coração
e não te apoie no teu próprio entendimento”*

Provérbios 3:5.

Resumo

O *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus sem envelope e contém um DNA fita simples circular com 1,7 kb de tamanho. O vírus pertence ao gênero *Circovírus* da família Circoviridae. O PCV2 é o agente etiológico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (PMWS), doença que causa grande impacto econômico na suinocultura mundial. O objetivo deste trabalho foi desenvolver a técnica de STNPCR para detecção do *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) bem como avaliar a presença de diferentes variantes virais em Pernambuco. Foram utilizados controles positivos, negativos, e 55 amostras de tecidos de animais clinicamente normais obtidas em abatedouro. Para o desenvolvimento da STNPCR foram avaliadas diferentes temperaturas de anelamento para os *primers* externos e internos. A atuação de ambos os pares de *primers* foi realizada de forma independente, sendo que o segundo par de *primers* foi imobilizado na parte interna da tampa do microtubo e após a primeira etapa de amplificação os *primers* foram eluídos por inversão do microtubo. Além disso, foi realizada a análise de achado técnico buscando encontrar os genótipos do PCV2 já descritos no Brasil e mundialmente, os subtipos PCV2a e PCV2b. Na aplicação clínica, a STNPCR foi comparada com a NPCR e resultaram em reações positivas para o PCV2 em 100% (55/55) das amostras analisadas, revelando igual sensibilidade e especificidade, porém, com menor risco de contaminação cruzada. Na análise de achado técnico (sequências da ORF2 do PCV2), foi possível identificar os genótipos PCV2a e PCV2b. A técnica molecular STNPCR demonstrou ser eficaz para detecção do DNA viral e pode ser aplicada em estudos epidemiológicos para o PCV2 e auxiliar no diagnóstico laboratorial da PMWS.

Palavras-chave: *Circovírus* suíno tipo 2; *nested*-PCR em tubo único; suíno

Abstract

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is a non-enveloped virus and contains a circular single-stranded DNA with 1.7 kb in size. The virus belongs to the genus *Circovirus* of the family Circoviridae. PCV2 is the etiologic agent of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), a disease that causes great economic impact in swine industry worldwide. The objective of this work was to develop the single-tube *nested* PCR (STNPCR) technique for detection of PCV2 DNA and to assess the presence of different variants of this virus in Pernambuco. We used positive and negative controls and 55 tissue samples obtained from pigs in a slaughterhouse. For the development of STNPCR, it was evaluated different annealing temperatures for external and internal primers. The performance of both primer pairs was carried out independently. The second pair of primers was onto the microtube cap and, after the first round of amplification, the primers were eluted by inversion of the microtube. The STNPCR was compared with NPCR and resulted in positive reactions to PCV2 in 100% (55/55) of samples analyzed, showing equal sensitivity and specificity, however, with less risk of cross contamination. Viral variants were found in Pernambuco. The STNPCR proved to be effective for viral DNA detection and can be applied in epidemiological studies of PCV2 and help PMWS diagnosis.

Key words: Porcine Circovirus type 2; Single-tube nested PCR; Swine.

Lista de Ilustrações

Figura 1	Esquema representativo do PCV2 com a distribuição das quatro principais ORFs, incluindo ORF1, ORF2, ORF3 e ORF4.	6
Figura 2	Esquema representativo da origem de replicação do PCV1 e do PCV2 .	7
Figura 3	Esquema representativo do ciclo de infecção do PCV.	8
Figura 4	Esquema representativo da <i>nested</i> -PCR em tubo único (STNPCR).	17
Quadro 1	20 Princípios de Madec	18
Quadro 2	Vacinas Comerciais	19
Figura 5	Esquema representativo da ORF2 de PCV2 mostrando as regiões de anelamento dos <i>primers</i> externos e sequências específicas dos subtipos virais.	26
Figura 6	Desenvolvimento da STNPCR.	27
Figura 7	Gel representativo da STNPCR na detecção do PCV2 em amostras clínicas.	28
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR (A), NPCR (B) e STNPCR (C).	29
Quadro 3	Resultado do sequenciamento e análise bioinformática das amostras e do controle positivo de referência.	31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Detecção do DNA de PCV2 em amostras clínicas utilizando as técnicas de PCR, NPCR e STNPCR.	29
Tabela 2	Classificação das amostras de PCV2 oriundas de Pernambuco com base em nucleotídeos nas posições 262-267 das sequências da ORF2.	32

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

BFDV	<i>Vírus da doença dos bicos e penas dos psitacídeos</i>
CaCV	<i>Circovírus dos canários</i>
CoGV	<i>Circovírus dos gansos</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
KI	Lisina e Isoleucina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPCR	<i>Nested-PCR</i>
ORFs	Regiões abertas de leitura (<i>Open Reading Frames</i>)
ORF1	Região que codifica duas proteínas associadas à replicação viral
ORF2	Região que codifica proteína do capsídeo viral
ORF3	Região que codifica proteína relacionada a apoptose
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCVD ou PCVAD	Doenças associadas ao <i>Circovírus</i> suíno
PCV1	<i>Porcine Circovirus type 1</i> (<i>Circovírus</i> suíno tipo 1)
PCV2	<i>Porcine Circovirus type 2</i> (<i>Circovírus</i> suíno tipo 2)
PDNS	Síndrome de Nefropatia e Dermatite Suína
PiCV	<i>Circovírus dos pombos</i>
PMWS	<i>Postweaning multisystemic wasting syndrome</i> (Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos)
PNP	Pneumonia Necrosante Proliferativa
PPV	<i>Parvovirus</i> suíno
PR / PL	Prolina e Arginina / Prolina e Leucina
PRDC	Doenças do Complexo Respiratório Suíno
<u>SNPRSV</u>	Serina / Asparagina / Prolina e Arginina / Serina / Valina

SPF Específico Livre de Patógenos (*Specific Pathogens Free*)

TNKS [L_{62/64}] **Treonina** / Asparagina / **Lisina e Isoleucina** / Serina / **Isoleucina**

Sumário

Pontes, Nayara Evaristo de	3
571.99211 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2014- 198	3
.....	3
1. Introdução.....	17
2. Revisão da Literatura.....	20
2.1 Suinocultura.....	20
2.2 Histórico	21
2.3. O Agente etiológico (PCV2).....	22
2.4 Síndrome Multissistêmica do Debrinhamento de Suínos (PMWS).....	27
2.4.1. Sinais Clínicos.....	28
2.4.2. Transmissão.....	29
2.4.3. Distribuição	30
2.5. Diagnóstico.....	30
2.5.1. Hibridização in situ e Imuno-histoquímica	31
2.5.2. PCR, NPCR e PCR em tempo real.....	32
2.5.3. STNPCR.....	32
2.6. Controle.....	34
2.7. Vacinas Comerciais	35
3. Objetivos.....	37
3.1. Geral.....	37
3.2. Específicos.....	37
4. Material e Métodos.....	38
4.1. Amostras controles e Amostras clínicas.....	38
4.2. Construção do controle positivo de referência.....	38
4.3. Primers.....	39
4.4. Nested-PCR em tubo único (STNPCR).....	39
4.5. Ensaios de sensibilidade e especificidade.....	40
4.6. Comparações da STNPCR, NPCR e PCR Convencional.....	40
4.7. Análise dos produtos da PCR.....	41
4.8. Sequenciamento e Análise bioinformática.....	41
4.9. Estudo de achado técnico.....	42
5. Resultados.....	44
5.1. Nested-PCR em tubo único (STNPCR).....	44
5.2. Ensaio de sensibilidade e especificidade.....	45
5.3. Aplicação clínica	46
5.4. Sequenciamento e Análise Bioinformática.....	47

5.5. Estudo de Achado Técnico.....	49
6. Discussão.....	50
7. Conclusões.....	54
8. Referências Bibliográficas.....	55
9. Anexos.....	65
10. Curriculum vitae (Lattes).....	67

1. Introdução

O *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus sem envelope e contém um DNA fita simples circular com 1,7 kb de tamanho. O vírus pertence ao gênero *Circovírus* da família *Circoviridae* (Murphy *et al.*, 1995). O genoma viral contém três principais janelas de leitura: a ORF1 que codifica as replicases, a ORF2 que codifica a proteína do capsídeo e a ORF3 que codifica uma proteína relacionada a apoptose e a ORF4 envolvida na replicação viral (Gao *et al.*, 2013). Dados sorológicos e técnicas moleculares de PCR (reação em cadeia da polimerase) indicam que a infecção pelo PCV2 está amplamente distribuída entre a população suína mundial. Anticorpos para PCV2 foram encontrado em suínos de todos os continentes, com usual soroprevalência em torno de 100% na idade de abate dos animais. A infecção viral pode ocorrer em rebanhos afetados e não afetados pela PMWS (Opriessnig *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, houve grande desenvolvimento no sistema de produção de suínos, principalmente quanto à genética, nutrição, manejo e sanidade. Os animais passaram a serem criados de forma cada vez mais intensiva, os rebanhos ficaram maiores e, conseqüentemente, com maior predisposição às doenças, dentre elas, a PCVD associada ao *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) (Segalés *et al.*, 2005b; Baekbo *et al.*, 2012).

A terminologia doenças associadas ao *Circovírus* suíno (PCVD ou PCVAD) engloba todas as condições clínicas associadas à infecção pelo PCV2. A Síndrome Multissistêmica do Definhamento de Suínos (PMWS) é a principal manifestação clínica da PCVD (Segalés *et al.*, 2005a; Baekbo *et al.*, 2012). Estudos relatam casos de PMWS onde ocorre a coinfeção do PCV2 com o

Parvovirus suíno (PPV), sugerindo a atuação do PPV como importante cofator no desenvolvimento da PMWS (Opriessnig et al., 2013). Dentro da PCVD, estão também incluídas a Síndrome de Nefropatia e Dermatite Suína (PDNS), falhas reprodutivas, Enterite associada ao PCV2, Pneumonia Necrosante Proliferativa (PNP) e Doenças do Complexo Respiratório Suíno (PRDC) (Opriessnig et al., 2007).

O diagnóstico da PCVD é complexo pelo fato de haver uma multiplicidade de órgãos envolvidos, sinais clínicos inespecíficos, sistema imune comprometido e a presença de patógenos concorrentes que mascaram o diagnóstico diferencial comprometendo os programas de controles da doença. Assim, o exame laboratorial é fundamental para a obtenção do diagnóstico definitivo da enfermidade (Barbosa et al., 2008).

A literatura cita o desenvolvimento e aplicação com êxito da *nested*-PCR em tubo único (STNPCR) para diagnóstico de patógenos humanos e animais (Abath et al., 2002; Souza et al., 2007). No entanto, não há registro do desenvolvimento da STNPCR para o PCV2. A padronização desta técnica para a identificação da presença do PCV2 será de grande importância para suinocultura da região, pois permitirá que a UFPE possa agir como referência para esse diagnóstico. Além disso, o estabelecimento da STNPCR viabilizará sua aplicação no desenvolvimento de diferentes testes diagnósticos aplicados a doenças infecciosas que acometem animais e acometem o homem.

Recentemente foi descrito na literatura o estudo da história evolutiva do PCV2, evidenciando suas variações e subtipos encontrados. Assim como, ainda não foi realizado um trabalho sobre a caracterização viral no Estado de Pernambuco.

Então, é necessário um estudo para caracterização das amostras virais identificadas nos plantéis.

2. Revisão da Literatura

2.1 Suinocultura

Dados atualizados em 2012, do Centro de Inteligência de Aves e Suínos (Cias) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) considerando que, a carne suína consolidou-se como a mais importante fonte de proteína animal do mundo após 1978. A produção mundial cresceu numa taxa anual de 3,1% nos últimos 46 anos. Neste período, a produção foi acrescida em 75,2 milhões de toneladas. Para o ano de 2007 estimava-se uma produção mundial de 99,9 milhões de toneladas. O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores mundial ficando na 5ª posição detendo 3,26% da produção de carne suína, porém o seu consumo foi de apenas 12,3kg ficando abaixo da média mundial (16,5kg em 2007).

Com relação à suinocultura brasileira, a demanda do mercado pela carne suína somente apresentou um crescimento mais significativo a partir de meados da década de 1990, havendo um crescimento na taxa anual de produção de 5,7% (2,6% até início dos anos 90), enquanto no resto do mundo o crescimento foi de somente 2,2% (3,3% até início dos anos 90), ocorrendo uma reversão da situação no Brasil. Isso é justificado, depois da abertura comercial que possibilitou o crescimento das exportações nacionais através do incremento de tecnologias no setor e queda de preços deste produto ao consumidor final (EMBRAPA, 2012).

2.2 Histórico

O *Circovírus* suíno (PCV) foi relatado primeiramente por Tischer *et al.* (1974), mediante microscopia eletrônica, ao observarem um vírus morfológicamente semelhante a um picornavírus, que causava infecção persistente em cultivo celular de rim suíno (PK-15) sem induzir efeito citopático. Posteriormente, foi demonstrado que esse vírus possuía um genoma composto por um filamento único de DNA, circular e fechado, razão pela qual o denominaram de *Circovírus* suíno (Tischer *et al.*, 1986).

Em 1991, na região sul do Canadá, descreveu-se a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (PMWS) (Clark, 1997). A PMWS foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 2000 (Zanella & Morés, 2000; Ciacchi-Zanella & Morés, 2003). Desde então casos novos de suspeita clínica com confirmação laboratorial foram identificados e encontram-se disseminados por parte do território nacional causando grandes perdas econômicas para a suinocultura brasileira (Zanella *et al.*, 2001; Barbosa *et al.* 2008).

Esta síndrome acomete suínos de cinco a 12 semanas de idade e se caracteriza por caquexia, perda de apetite, palidez, emagrecimento progressivo, dispneia, linfadenopatia, icterícia, com mortalidade de aproximadamente 10% (Segalés *et al.*, 2005a).

Hamel *et al.* (1998) descreveram toda a sequência genômica do agente causal dos surtos e associaram ao vírus descrito anteriormente por Tischer (1974). Concluíram que esta variante do vírus apresentava diferenças em relação ao *Circovírus* não patogênico anteriormente isolado nas células de rim de suínos PK-15 (68% de identidade) (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998).

Desta forma o Circovírus patogênico, associado aos sinais clínicos relatados, foi denominado de *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2), enquanto que o Circovírus não patogênico passou a ser conhecido como *Circovírus* suíno tipo 1 (PCV1) (Meehan *et al.*, 1998).

Além da PMWS, várias doenças foram associadas ao PCV2 e são conhecidas como doenças associadas ao *Circovírus* suíno (PCVD ou PCVAD). Neste grupo estão incluídas PMWS, Síndrome de Nefropatia e Dermatite Suína (PDNS), falhas reprodutivas, Enterite associada ao PCV2, Pneumonia Necrosante Proliferativa (PNP) e Doenças do Complexo Respiratório Suíno (PRDC) (Opriessnig *et al.*, 2007).

2.3. O Agente etiológico (PCV2)

O PCV2 é um vírus sem envelope e contém um DNA fita simples circular com 1,7Kb de tamanho. O vírus pertence ao gênero *Circovírus* da família Circoviridae (Murphy *et al.*, 1995). Vírus pertencentes a esta família tem em comum a simetria icosaédrica, ausência de envelope, genoma covalentemente fechado e pequeno (1759-2319 nucleotídeos), medindo de 16 à 18nm composto por DNA fita simples circular (característica que permite distingui-los dos demais vírus). Nesta família também estão incluídos o vírus da doença dos bicos e penas dos psitacídeos (BFDV), *Circovírus* dos pombos (PiCV), *Circovírus* dos canários (CaCV) e *Circovírus* dos gansos (CoGV) (Todd, 2000; Finsterbusch & Mankertz, 2009).

O genoma do PCV2 possui 1768 nucleotídeos sendo composto por quatro principais ORFs (“*open reading frames*” – regiões abertas de leitura). A ORF1 (945nt), que se estende do nucleotídeo 51 aos 995, é responsável pela codificação de duas proteínas associadas à replicação viral, a Rep e Rep’. A

ORF2 (702nt), que se estende do nucleotídeo 1735 aos 1034, codifica uma proteína do capsídeo viral, a Cap, a qual é o principal determinante antigênico do vírus. A ORF3 (315nt), que se estende do nucleotídeo 671 aos 357, está envolvida no processo de indução de apoptose pela ativação da rota iniciador caspase-8 e efetor caspase 3 (Fan *et al.*, 2007; Finsterbusch & Mankert, 2009; Vilcek *et al.*, 2010), e a ORF4 (180nt) mais recente identificada foi expressa, que se estende do nucleotídeo 565 aos 386, tem função na replicação viral e patogenicidade. A ORF3 e a ORF4 são localizadas dentro da região do gene Rep (ORF1). Além disso, um novo RNA mensageiro ORF3' associado ao gene ORF3 foi identificado durante a replicação viral e foi demonstrado primeiro relato de *trans-splicing* no processo de maturação do RNA mensageiro em células PK-15 infectadas por PCV2 (Gao *et al.*, 2013) (Figura 1).

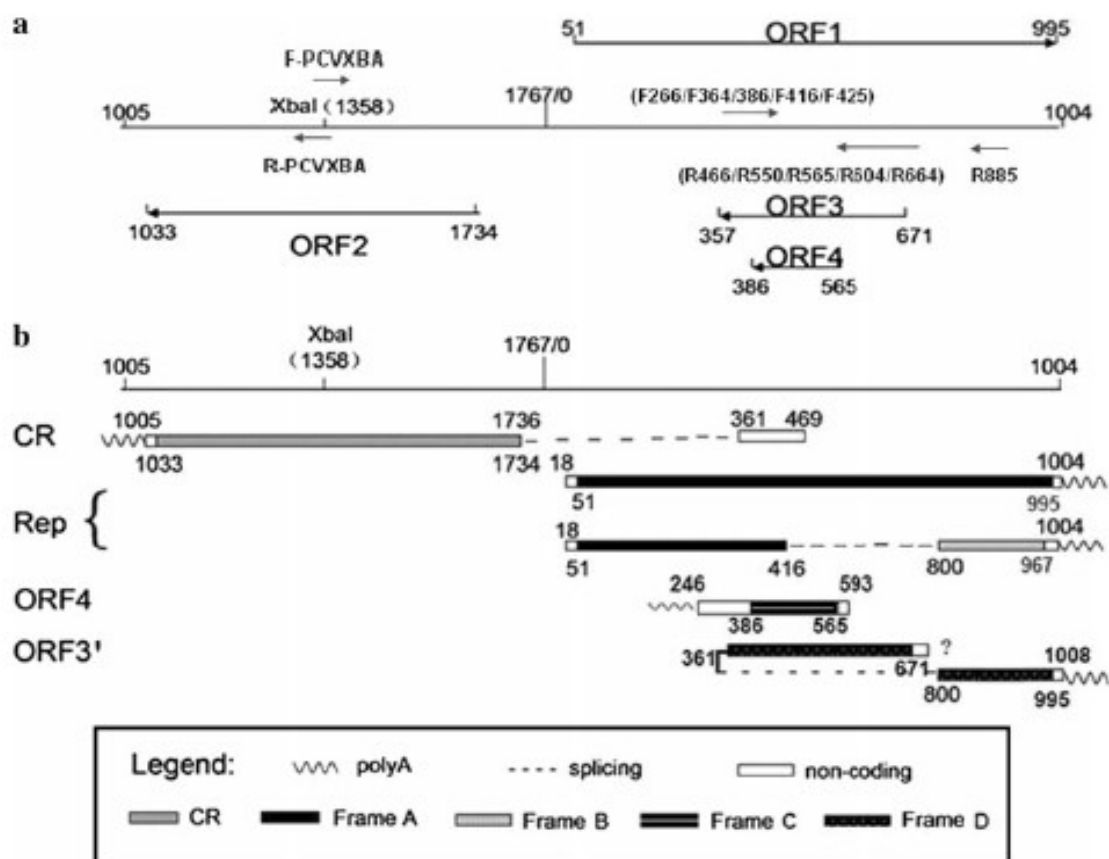


Figura 1: Esquema representativo do PCV2 com a distribuição das quatro principais ORFs, incluindo ORF1, ORF2, ORF3 e ORF4 (Gao *et al.*, 2013).

A origem de replicação está localizada na região intergênica do genoma do PCV2, com aproximadamente 84 nt (posição 1735 aos 1768 e 1 aos 51) sendo caracterizada por uma suposta estrutura haste-laço composta por uma sequência de nove nucleotídeos (5' – (A/T) AGTATTAC – 3' em PCV2 e PCV1, respectivamente) a qual é conservada em todos os Circovírus e ladeada por uma repetição invertida (palíndromo) de 11 nucleotídeos (Figura 2). Adjacente a esta estrutura, existe uma sequência de seis nucleotídeos (hexâmero) repetidos. O genoma do PCV2 se replica por meio da replicação círculo rolante (RCR) (Finsterbusch & Mankertz, 2009).

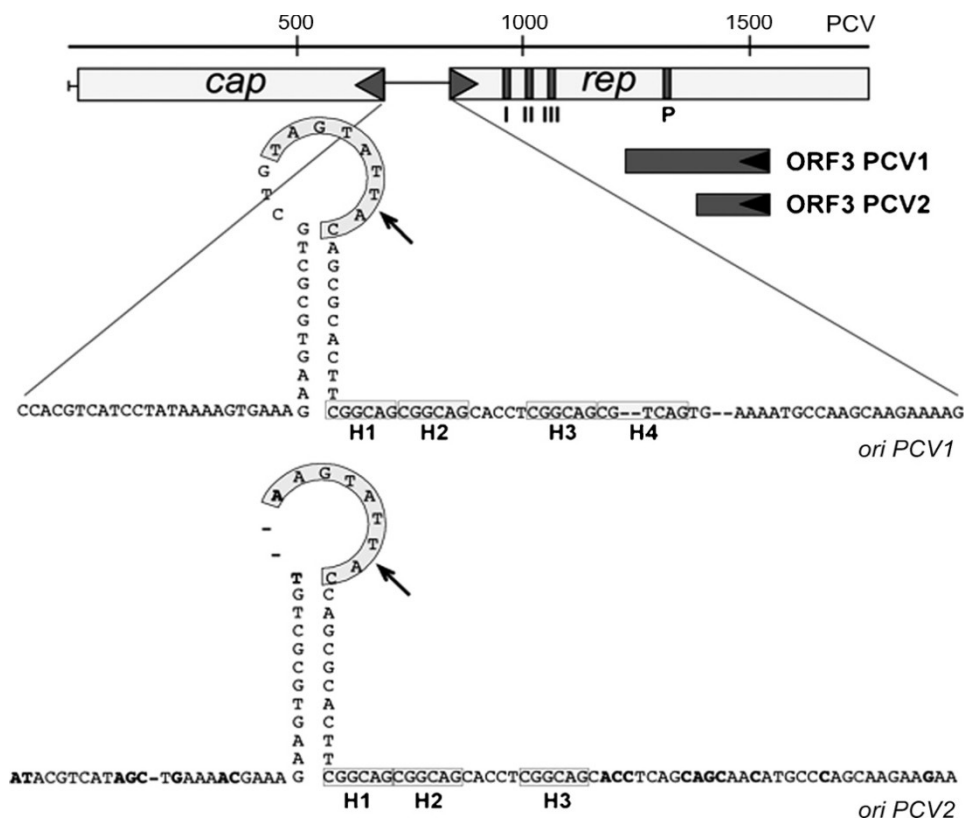


Figura 2: Esquema representativo da origem de replicação do PCV1 e do PCV2 (Finsterbusch & Mankertz, 2009).

Os circovírus são os menores vírus capazes de replicação autônoma em células de mamíferos. Devido à sua simplicidade genômica e estrutural, a

replicação requer a participação de várias proteínas das células hospedeiras e ocorre durante a fase S do ciclo celular. A replicação do genoma viral ocorre no núcleo das células e envolve a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla (replicativo intermediário). Após a síntese do replicativo intermediário, o genoma é, provavelmente, replicado pelo mecanismo de círculo rolante (Figura 3). A replicação do genoma se inicia logo após a penetração do vírus na célula, pela síntese da fita complementar de DNA. Sítios de ligação de fatores de transcrição possuem papel importante na regulação da transcrição do genoma (região do promotor) e constituem a parte não transcrita do genoma. Após sua síntese, o DNA replicativo intermediário é transcrito em RNA mensageiro (RNAm). A partir do DNA replicativo intermediário, são produzidas moléculas de DNA de fita simples circulares, correspondentes ao DNA genômico. Essas moléculas são encapsuladas por múltiplas cópias da proteína do capsídeo. A morfogênese ocorre no núcleo por mecanismos ainda não esclarecidos (Nascimento, 2009 *apud* Flores, 2007).

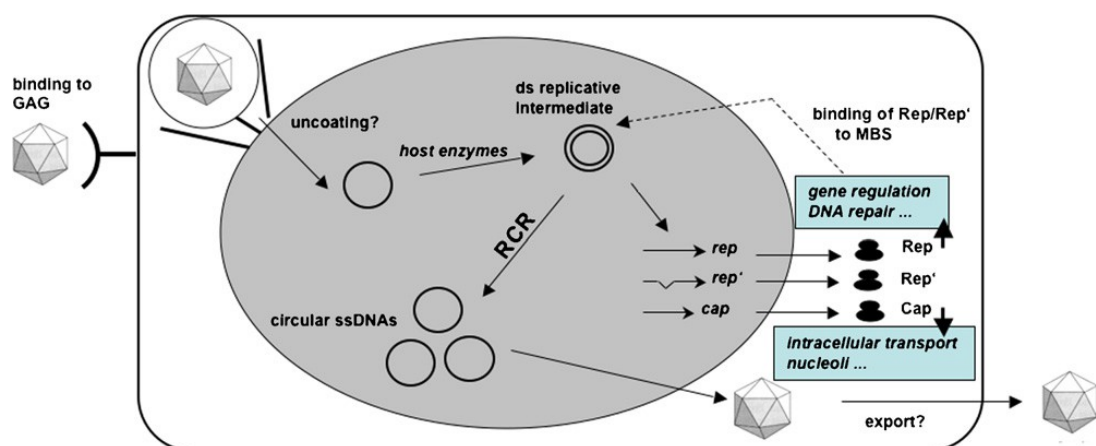


Figura 3: Esquema representativo do ciclo de infecção do PCV (Finsterbusch & Mankertz, 2009).

Análises filogenéticas demonstraram dois maiores grupos de PCV2, que ainda foram separados em clusters múltiplos: PCV2-grupo 1 (subtipo PCV2b) com

3 clusters (1A, B e C) e PCV2-grupo 2 (subtipo PCV2a) com 5 clusters (2A-D e E). O comprimento do genoma viral do grupo 1 é 1767 nucleotídeos, ao passo que o comprimento do genoma viral do grupo 2 é 1768 nucleotídeos (Olvera *et al.*, 2007). Ao nível de nucleotídeos, o PCV1 e o PCV2 compartilham cerca de 70% de identidade entre eles. Enquanto que os genótipos PCV2a e PCV2b compartilham uma identidade de aproximadamente 95%, e a principal diferença entre os genótipos de PCV2 ocorre no gene da ORF2, região com maior variabilidade nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos. Tem sido proposto que as diferenças nas sequências de aminoácidos implicam em diferenças na patogênese, portanto o subtipo PCV2b parece ser mais virulento que o subtipo PCV2a (Trible & Rowland, 2012). Estudos de patogênese celular demonstraram diferenças entre PCV2b e PCV2a, onde PCV2b foi bem mais eficiente na infecção e virulência de células do que PCV2a (Dvorak *et al.*, 2013). Além disso, foram descritos os subtipos PCV2c, PCV2d e PCV2e, respectivamente (Dupont *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Jantafong *et al.*, 2011).

Um estudo de caracterização genética baseada nas sequências que codificam a proteína do capsídeo (ORF2) identificou diferenças na sequência de nucleotídeos entre os dois grupos de genótipos PCV2, com o grupo 1 (PCV2b) tendo a sequência **CCCCG/TC** (nucleotídeos 262-267) que codifica para Prolina e Arginina / Prolina e Leucina (**PR/PL**), enquanto o grupo 2 (PCV2a) tem a sequência **AAAATC** (nucleotídeos 262-267) que codifica para a **lisina e isoleucina (KI)** (Olvera *et al.*, 2007).

O Circovírus resiste à inativação quando exposto ao ambiente ácido (pH 3), a clorofórmio, a temperaturas entre 56°C e 70°C, ao congelamento, à luz

ultravioleta e a desinfetantes. O agente infeccioso permanece estável em fezes e secreções respiratórias (Shibata *et al.*, 2003).

Estudos revelam que os PCVs podem ser inativados por desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), por agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e por amônio quaternário ou fenol. O PCV2 resiste à ação de desinfetantes comerciais com base em álcool, clorexidina ou iodo (Royer *et al.*, 2001).

2.4 Síndrome Multissistêmica do Definhamento de Suínos (PMWS)

A PMWS é uma doença emergente causada pelo PCV2, de grande importância econômica, com distribuição mundial e que causa elevada mortalidade em suínos nas fases de creche e de crescimento - terminação (Larochele *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2005b).

A PMWS foi diagnosticada pela primeira vez no Canadá, em 1991, porém existem relatos de estudos retrospectivos sobre a identificação da doença em amostras de soros suíno coletadas em abatedouro no Canadá, em 1985 e 1989, indicando que o PCV2 estava presente nestes suínos antes da primeira identificação da PMWS (Ciacci-Zanella *et al.*, 2006 *apud* Magar *et al.*, 2000).

A sua primeira identificação no Brasil ocorreu em 2000 (Zanella & Morés, 2000), porém estudos retrospectivos de tecidos arquivados desde 1988 indicam que a doença possa ter ocorrido antes da sua primeira identificação em 2000 (Ciacci-Zanella *et al.*, 2006).

2.4.1. Sinais Clínicos

A PMWS acomete suídeos, principalmente de cinco a 12 semanas de idade, e os sinais clínicos mais comuns são: disfunção respiratória, emagrecimento progressivo e diarreia. As lesões macroscópicas são variáveis, sendo mais frequentes é a pneumonia intersticial e a linfadenopatia sistêmica especialmente envolvendo os linfonodos inguinais, mesentéricos, brônquicos e mediastinos que podem apresentar-se brancacentos e homogêneos à superfície de corte, além de lesões no pulmão, rins, intestino grosso e baço. As lesões histopatológicas são representadas por diminuição do número de linfócitos, proliferação de histiócitos e formação de células multinucleadas (Allan & Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2005a; Opriessnig *et al.*, 2007).

Animais afetados pela PMWS apresentam também desidratação e icterícia (Ciacci-Zanella & Morés, 2003), distúrbios do sistema nervoso (Harding, 1998) caracterizados por tremores, desordens locomotoras, prostração, convulsões e depressão (Choi *et al.*, 2002).

Tipicamente, os sinais clínicos são evidentes em 5-15% dos animais afetados pela PMWS (muitos destes suínos morrem ou são sacrificados), a maior parte dos problemas ocorrendo no final da fase de amamentação (desmame) ou no início do período de engorda (Sorden, 2000).

Segundo Darwich *et al.* (2004), quando da ocorrência da PMWS, cerca de 5-20% dos suínos entre 7 e 15 semanas de idade serão afetados, dos quais 80% morrerão e aproximadamente 20% desses que desenvolveram o quadro clínico, se recuperarão.

2.4.2. Transmissão

A detecção de PCV2 em *swab* nasal, tonsilar, brônquico, urinário e fecal sugere que as vias de transmissões podem ser as secreções oro-nasal, fecal e urinária de animais com e sem sinais clínicos da PMWS. No entanto, quando o animal apresenta sinais clínicos, a excreção do vírus é mais intensa (Segalés *et al.*, 2005b).

O contato com suínos infectados, instalações, equipamentos e fômites são fatores prováveis na transmissão horizontal do vírus; fatores de risco causadores de estresse, como densidade elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes com procedência e idades diferentes e presença de enfermidades concomitantes podem intensificar as manifestações clínicas e favorecer o desenvolvimento da doença (Madec *et al.*, 2000).

O vírus foi detectado em sêmen de suíno infectado experimentalmente com PCV2 (Kim *et al.*, 2001). A associação do PCV2 com abortos e natimortos indica que a transmissão transplacentária também pode ser um fator importante se matrizes soros-negativa forem infectadas durante a prenhez (Allan & Ellis, 2000).

Segundo Madec *et al.* (2000), o período de transmissão ocorreria entre a 5^a e a 16^a semanas, com fase crítica e mortes ocorrendo por volta da 13^a semana. Segundo Ciacci-Zanella & Morés (2003) os prejuízos determinados pela PMWS, além das mortes, devem-se ao declínio das taxas de crescimento e à queda da conversão alimentar determinada pela elevação do número de suínos refugos e/ou debilitados.

2.4.3. Distribuição

O PCV2 tem sido diagnosticado em países onde tem ou não relatos da PCVD (Allan & Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2005a). Isto tem sido demonstrado por métodos de detecção sorológica, assim como viral. Anticorpos para PCV2 foram encontrados em suínos de todos os continentes, com usual soroprevalência em torno de 100% na idade de abate dos animais. A alta prevalência de circulação viral foi confirmada pela utilização de métodos de PCR em amostras de sangue ou soro, a maioria se não todos os animais adquiriram a infecção em algum momento durante as fases de produção - creche ou crescimento - sem necessariamente desenvolver a doença (Larochelle *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2005b). Portanto, é importante reconhecer que a infecção por PCV2 pode ocorrer na ausência da circovirose (Sorden, 2000).

Investigações sorológicas para detecção de anticorpos para PCVs foram feitas em suínos na Alemanha (Tischer *et al.*, 1986), Canadá (Dulac & Afshar, 1989), Grã-Bretanha (Edwards & Sands, 1994), Irlanda do Norte (Allan *et al.*, 1994), e revelaram que o vírus está difundido na população suína. No Brasil, acredita-se que a infecção por PCV2 esteja disseminada em rebanhos afetados e não afetados por PMWS (Ciacchi-Zanella *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2008).

2.5. Diagnóstico

A vasta disseminação do PCV2 na população de suínos representa uma dificuldade na avaliação do estado sanitário do plantel. Por esta razão, a detecção do agente/ a detecção de produtos da sua replicação ou a presença de anticorpos

apenas indicam a presença de infecção, não sendo em nenhum caso indicativo de doença (Castro *et al.*, 2007).

A grande gama de manifestações clínicas da PMWS indica que é necessário se obter um extenso e variável diagnóstico diferencial. O diagnóstico precisa seguir basicamente três critérios: (i) identificação da presença de sinais clínicos compatíveis, (ii) identificação da presença de lesões linfoides características, e (iii) detecção do agente (PCV2) dentro dessas lesões (Finsterbusch e Mankertz, 2009).

A literatura descreve várias técnicas de diagnóstico para a detecção do PCV2, dentre elas, isolamento viral, imuno-histoquímica, hibridização *in situ*, PCR, *nested*-PCR (NPCR), e PCR em tempo real (Ellis *et al.*, 1999; Allan & Ellis, 2000; Kim & Chae, 2003; Ciacchi-Zanella *et al.*, 2006; Vilcek *et al.*, 2010; Zheng L-I *et al.*, 2013).

2.5.1. Hibridização *in situ* e Imuno-histoquímica

A Hibridização *in situ* (HIS) para PCV2 utiliza uma sonda de DNA marcada que corresponde a uma parte do genoma do PCV2. Na imuno-histoquímica (IHQ) utiliza-se um anticorpo monoclonal ou policlonal para detectar antígeno de PCV2 em secções de tecido fixadas com formol e embebidas em parafina. A HIS demonstra ser mais específica (Opriessnig *et al.*, 2007).

Barbosa & Freitas (2008) utilizaram a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) para demonstração de anticorpos contra o *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) e detectaram títulos de

anticorpos nas faixas etárias de duas a três semanas até animais acima de 24 semanas de idade, indicando que a infecção viral ocorreu endemicamente.

2.5.2. PCR, NPCR e PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode diferenciar PCV1 e PCV2, sendo considerada uma técnica muito sensível. Um PCR quantitativo determina a quantidade de ácido nucleico viral em soro e tecidos, portanto tem um valor preditivo da evolução clínica, podendo ser bastante útil no diagnóstico (Segalés *et al.*, 2005b).

Ciacchi-Zanella *et al.* (2006) identificaram o *Circovírus* suíno tipo 2 por NPCR e imuno-histoquímica. Larochelle *et al.* (1999) utilizaram a multiplex PCR para detecção do *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2).

KIM *et al.* (2001) desenvolveram a multiplex *nested*-PCR para detecção e diferenciação do PCV1 e PCV2 em sêmen de suíno, e encontraram 50% (30/60) de positividade para o PCVs (sendo 20 amostras positivas tanto para o PCV1 quanto para o PCV2). Kim & Chae (2003) utilizaram a multiplex *nested*-PCR para diferenciar PCV1, PCV2 e *parvovirus* suíno (PPV) em tecidos incluídos em parafina e compararam a técnica de multiplex *nested*-PCR com a técnica de hibridização *in situ* e obtiveram 100% de positividade para os agentes virais.

Recentemente, a PCR em tempo real foi otimizada e vem sendo utilizada na detecção do PCV2 (Vilcek *et al.*, 2010; Zheng L-I *et al.*, 2013).

2.5.3. STNPCR

A técnica de PCR é um método molecular capaz de amplificar uma sequência específica de DNA, sendo sensível e específica aliada à simplicidade de execução e aplicação em diagnóstico de várias doenças. Entretanto, em algumas situações, a PCR convencional não é suficiente para a detecção de uma determinada sequência de DNA. Para estas situações uma variação da PCR é empregada, denominada de “*nested*” PCR (NPCR) (Ciacci-Zanella *et al.*, 2006). A NPCR constitui-se de uma dupla reação de PCR. A reação de PCR inicial é processada e seu produto final usado como “*template*” em uma segunda reação de PCR, usando agora “*primers*” internos aos da primeira reação. Isto aumenta a sensibilidade da detecção, no entanto, também aumenta os riscos de contaminação. Na tentativa de reduzir esta possibilidade de contaminação, uma modificação no procedimento foi inserida de modo que as duas reações possam ocorrer em um mesmo todo. Esta variação da técnica foi denominada de “*nested*” PCR em tubo único (STNPCR) (Souza *et al.*, 2007), (Figura 4).

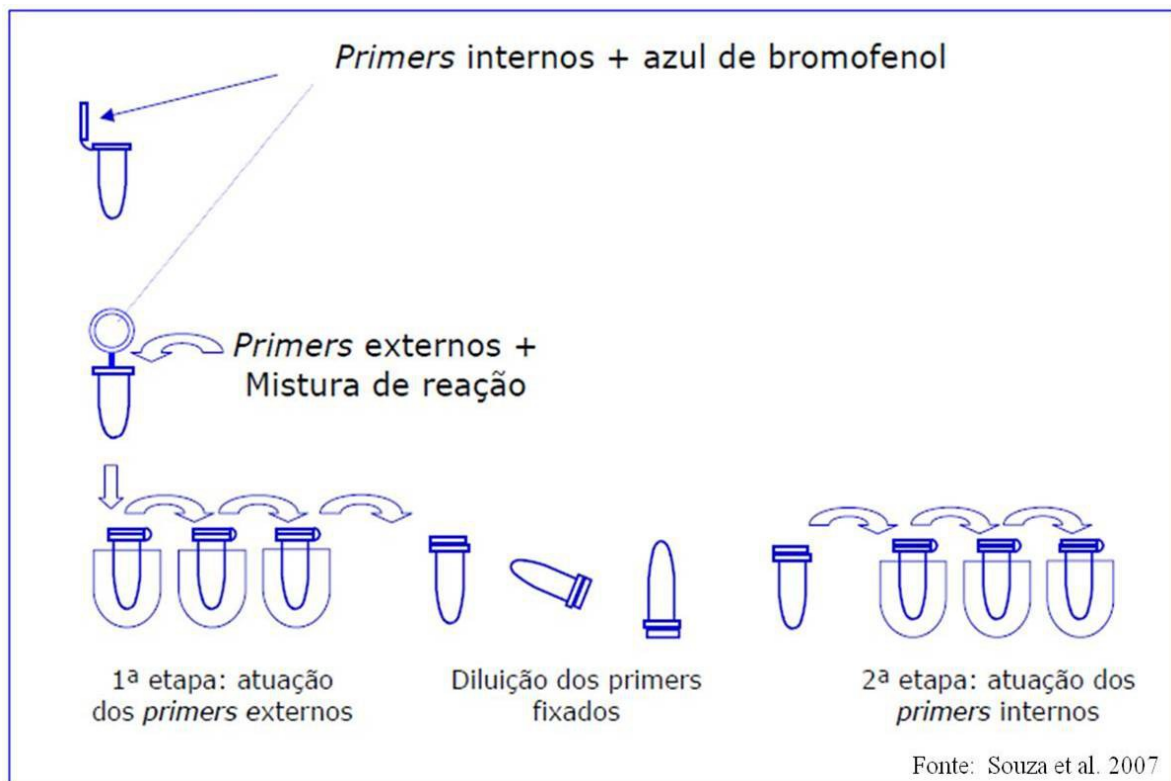


Figura 4: Esquema representativo da *nested*-PCR em tubo único (STNPCR) (Souza *et al.*, 2007).

2.6. Controle

Atualmente não se conhece uma forma capaz de controlar a PMWS de modo eficiente e nem um tratamento efetivo para essa enfermidade. Em geral propriedades acometidas por PCV2 apresentam muitos erros de manejo e de forma a superar essas deficiências, Madec *et al.* (2000) criou um conjunto de medidas de manejo que ficaram conhecidas como o plano dos 20 princípios de Madec (Quadro 1).

Quadro 1: 20 Princípios de Madec (Madec, 2000).

Setor da Granja	Medidas a serem adotadas
Maternidade	1.Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canaletas
	2.Lavar as matrizes e fazer uso de antiparasitários
	3.Evitar adoções de leitões por outra matriz
	4.Usar programas de vacinação adequados
Creche	5.Uso de pequenas pocilgas com paredes divisórias sólidas
	6.Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canaletas
	7.Densidade animal: 3 suínos por m ²
	8.Bebedouro com 7 cm por leitão
	9.Boa ventilação
	10. Manter temperaturas de conforto
Engorda	11.Não misturar lotes de animais
	12.Uso de pequenas pocilgas com paredes divisórias sólidas
	13.Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canaletas
	14.Densidade animal: 0.75m ² por animal
	15. Assegurar boa ventilação e temperatura adequada
	16.Não misturar animais de diferentes lotes
Todos os setores	17.Não misturar animais de diferentes idades
	18.Respeitar o fluxo de animais e de ar
	19.Respeitar regras de higiene quando da intervenção como castrações, injeções, etc...
	20.Remover casos confirmados de PCVAD para a enfermaria

2.7. Vacinas Comerciais

Até o presente momento, quatro vacinas já foram produzidas (Quadro 2) e são baseadas em cepas do genótipo PCV2a. A primeira vacina no mercado foi a CIRCOVAC®, do laboratório Merial, com PCV2 inativado, adjuvante oleoso para uso em matrizes e marrãs de duas a quatro semanas antes da parição, disponível no Canadá, Europa e Brasil (Garcia, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2011).

As outras três vacinas comerciais são vacinas recombinantes, utilizadas em suínos em crescimento, ao redor da terceira semana de idade. Suvaxyn PCV2 OneDose® é produzida com base em um vírus quimérico da infecção, que contém o gene imunogênico ORF2 do PCV2 inserido na estrutura genômica central não patogênica do PCV1, disponível nos Estados Unidos, aprovada pela

Comissão Técnica Nacional (CTNBIO), já que é um produto geneticamente modificado. A empresa espera liberação para comercialização no Brasil pelo Ministério da Agricultura. Ingelvac CircoFLEX®, disponível nos Estados Unidos, e Porcilis PCV® Circumvent®, não disponível no Brasil, são vacinas de subunidades baseadas em um produto da ORF2 expresso no baculovirus (Garcia, 2008; Kekarainen *et al.*, 2010).

Uma nova variante PCV2b foi encontrada nos Estados Unidos, associada a PCVAD em animais já vacinados e que não obtiveram resposta imunológica, visto que as vacinas comerciais são baseadas no genótipo PCV2a, não tendo ação protetiva contra esta variante PCV2b (Opriessnig *et al.*, 2013).

Quadro 2: Vacinas Comerciais (Grau-Roma *et al.*, 2011).

Vacina	Laboratório	Antígeno	Posologia	Licenciado para
CIRCOVAC®	Merial	PCV2 inativado	2ml duas doses para primíparas e depois 1 dose por ciclo	Reprodutoras
Porcilis PCV® Circumvent®	Intervet	Proteína ORF2 de PCV2	2ml uma dose	Leitões > 3 semanas
Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	Proteína ORF2 de PCV2	1ml uma dose	Leitões > 2 semanas
Suvaxyn PCV2 One Dose®	Fort Dodge	Quimera inativada PCV1-PCV2	2ml duas doses	Leitões > 4 semanas

3. Objetivos

3.1. Geral

Desenvolver a técnica de STNPCR para detecção do *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) bem como avaliar a presença de diferentes variantes deste vírus em Pernambuco.

3.2. Específicos

1. Padronizar a técnica baseada em *nested*-PCR para detecção de PCV2.
2. Avaliar a sensibilidade da STNPCR em amostras clínicas de suínos.
2. Descrever as variantes de PCV2 circulantes em Pernambuco.

4. Material e Métodos

4.1. Amostras controles e Amostras clínicas

Foram utilizados controles positivos e negativos de referência para o PCV2, gentilmente, cedidos pelo Laboratório MICROVET e Embrapa Suínos e Aves, SC. Ambos os controles de referência foram obtidos a partir de linfonodos inguinais. As amostras negativas de referência foram obtidas a partir de células (SK6) e de células SK6 positivas para o PCV1 de rim de suínos. Foram coletadas, no abatedouro, 55 amostras de tecidos (30 linfonodos, 25 pulmões) de 25 suínos clinicamente saudáveis. Após a coleta, as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas em gelo e transportadas ao laboratório. Os tecidos foram fragmentados e pesados para obter 20 mg. O DNA total foi extraído pelo kit comercial Wizard® (Genomic DNA Purification - Promega, EUA) e armazenado a -20°C até a realização das análises.

4.2. Construção do controle positivo de referência

Para delimitar a ORF2 do PCV2, foi desenhado um par de *primers* com base na sequência do genoma viral BRA1, isolado no Brasil e depositado no GenBank (número de acesso DQ364650.1). O programa utilizado para desenhar os primers foi o Primer3 o qual se encontra disponível na internet (Rozen & Skaletsky, 1999). Os *primers* F0 (5' ATGACGTATCCAAGGAGGCG 3') e R0 (5' TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTC 3'). A ORF2 do PCV2 foi amplificada por PCR a partir da amostra de referência do PCV2. O produto amplificado esperado de 700 pb foi clonado no vetor pGEM-T (Promega, EUA) e a construção foram

transformadas em *E.coli* (DH5 alfa). Após a extração plasmidial a clonagem foi confirmada por sequenciamento.

4.3. Primers

A reação “outer-PCR” (externa) foi realizada com um par de *primers* externos F1: 5' - CGGATATTGTAGTCCTGGTCG -3' (posição 1095-1115) e R1: 5' - ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA -3' (posição 1570-1549), que amplificou um produto de 481 pb. A partir deste produto procedeu-se a reação “*nested-PCR*” (interna), utilizando um par de *primers* internos F2: 5' - GATTGTATGGCGGGAGGA GT -3' (posição 1286-1305) e R2: 5' - ATTGACGACTTTGTTCCCCC -3' (posição 1510-1491), que amplificou um produto final de 225 pb contido no fragmento anteriormente amplificado (Kim *et al.*, 2001).

4.4. Nested-PCR em tubo único (STNPCR)

A PCR convencional e a NPCR foram realizadas conforme descrito por Kim *et al.* (2001) com adaptações. A técnica de STNPCR foi realizada conforme descrita por Souza *et al.* (2007) com modificações. As duas etapas das reações foram analisadas de forma independentes e a temperatura de anelamento foi padronizada (sendo testadas, 60°C, 62°C e 65°C) para ambas as reações (externa e interna). Os parâmetros números de ciclos (15 e 45 ciclos) e concentração dos *primers* (1 pmol: 10 pmol) foram conforme citados por Souza *et al.* (2007). Resumidamente as reações foram otimizadas por concentrações de 1 U da Taq DNA Polymerase, 0,2 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), 1,5 mM de

MgCl₂, 0,04 µM de *primers* externos e 0,4 µM de *primers* internos (1 pmol: 10 pmol) e 4 µL dos controles e das amostras clínicas. 0,4 µM dos *primers* internos com marcações do corante azul de bromofenol foram previamente imobilizados no interior da tampa do tubo de *ependorf* 0,2 mL e incubados à temperatura ambiente até a secagem, após a imobilização dos *primers* internos a reação foi preparada. A primeira etapa de amplificação consistiu de 15 ciclos (95°C por 1 min, 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min). Após o término dos 15 ciclos, o termociclador foi interrompido à temperatura de 95°C e os tubos foram invertidos por cinco vezes até dissolver completamente os *primers* internos imobilizados na tampa do tubo. Posteriormente centrifugados por 1400 RPM por 30s e retornados a máquina para a segunda etapa de amplificação, que compreendeu desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, durante 45 ciclos.

4.5. Ensaios de sensibilidade e especificidade

A sensibilidade de detecção das metodologias foi avaliada através de diluições em série de DNA do controle positivo de referência. A concentração de DNA foi medida com espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). Foi testada a gama de diluições 2.5×10^8 a $2,5 \times 10^2$ cópias de DNA. Este procedimento foi realizado para todos os ensaios de PCR. A especificidade dos *primers* contra outros patógenos suínos foi previamente avaliado por Kim *et al.* (2001). No entanto, a especificidade dos iniciadores foi também testada utilizando as amostras negativas de referência.

4.6. Comparações da STNPCR, NPCR e PCR Convencional

A fim de avaliar o desempenho das técnicas STNPCR, NPCR e PCR convencional em amostras clínicas, foi utilizado DNA extraído de 55 amostras de tecidos de suínos. A comparação também foi realizada utilizando diluições seriadas do controle positivo para determinar a sensibilidade das técnicas.

4.7. Análise dos produtos da PCR

Todos os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Brometo de etídeo. A visualização do gel foi realizada por transiluminação em luz ultravioleta. O peso molecular do fragmento amplificado foi comparado com um marcador de peso molecular disposto no gel juntamente com as amostras e com os controles positivo e negativo da reação (Mendes *et al.*, 2008).

4.8. Sequenciamento e Análise bioinformática

Os amplicons foram sequenciados utilizando o kit ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, USA). A qualidade do sequenciamento e a montagem dos *contigs* foram realizadas com o auxílio dos programas Pregap4 e Gap4, que fazem parte do pacote Staden (<http://staden.sourceforge.net/>). Alinhamentos locais foram realizados com a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alinhamentos múltiplos utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) foram realizados entre as sequências do *Circovírus* suíno tipo 2 encontrado e as sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.9. Estudo de achado técnico

Nosso estudo de achado técnico baseou-se nos experimentos de Olvera *et al.* (2007). Um estudo de caracterização genética baseada nas sequências que codificam a proteína do capsídeo (ORF2) identificou diferenças nucleotídicas entre os dois grupos de genótipos PCV2, com o grupo 1 (PCV2b) tendo a sequência **CCCCG/TC** (nucleotídeos 262-267) que codifica para **Prolina e Arginina / Prolina e Leucina (PR/PL)**, enquanto o grupo 2 (PCV2a) tem a sequência **AAAATC** (nucleotídeos 262-267) que codifica para a **lisina e isoleucina (KI)** (Olvera *et al.*, 2007), (Figura 5).

PCV2a

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGTAGACGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTC CGCCGCCGCCCTG
GCTCGCCCATCCCCGCCACCGTTACCG CTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCG CCTCTC CGC CACTTCGGATATAC
TATCAAGCGAAGCAAGTCA AAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATAT R1

Posição 262-267

TAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAAC AAAATCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTG
AATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCAACAGGGTGACAGGGGAGTG GGCTCCAGTGCT GTTATTCTAGATGATACTTTGTAAACA
AAGGCCACAGCCCTCACTATGACCCCTATGTAACTACTCTCCCGTACTACCATAAACAGCCCTTCT OCTACCACTCCCGCTA
CTTTACCCCCAAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAAACCAATAACAAAAGAAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAA
ACCTCTGCAAATGTGGACCAAGTAGGCTCGGCACTGGGTTGAAAAACAGTATATA CGACAGGACTACAATATCCGTGTAAC
CATGTATGTACAATTACAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCGAGTTAACCCCTAA F1

PCV2b cluster 1 A/B

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGTAGACGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTC CGCCGCCGCCCTG
GCTCGCCCATCCCCGCCACCGTTACCG CTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCG CCTCTC CGC CACTTCGGATATAC
TATCAAGCGAAGCAAGTCA AAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATAT R1

Posição 262-267

TAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAAC CCCCCTCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGA
ATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCAACAGGGTGACAGGGGAGTG GGCTCCAGTG CTGTTATTCTAGATGATACTTTGTAAACA
AAGGCCACAGCCCTCACTATGACCCCTATGTAACTACTCTCCCGTACTACCATAAACAGCCCTTCT OCTACCACTCCCGCTAC
TTTACCCCCAAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAAACCAATAACAAAAGAAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAA
CCTCTGCAAATGTGGACCAAGTAGGCTCGGCACTGGGTTGAAAAACAGTATATA CGACAGGACTACAATATCCGTGTAAC
ATGTATGTACAATTACAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCGAGTTAACCCCTAA F1

PCV2b cluster 1 C

ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGTAGACGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTC CGCCGCCGCCCTG
GCTCGCCCATCCCCGCCACCGTTACCG CTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCG CCTCTC CGC CACTTCGGATATAC
TATCAAGCGAAGCAAGTCA AAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATAT R1

Posição 262-267

TAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAAC CCCCCTCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGA
ATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCAACAGGGTGACAGGGGAGTG GGCTCCAGTG CTGTTATTCTAGATGATACTTTGTAAACA
AAGGCCACAGCCCTCACTATGACCCCTATGTAACTACTCTCCCGTACTACCATAAACAGCCCTTCT OCTACCACTCCCGCTAC
TTTACCCCCAAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAAACCAATAACAAAAGAAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAA
CCTCTGCAAATGTGGACCAAGTAGGCTCGGCACTGGGTTGAAAAACAGTATATA CGACAGGACTACAATATCCGTGTAAC
ATGTATGTACAATTACAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCGAGTTAACCCCTAA F1

Em amarelo: Sequências específicas dos subtipos PCV2. Em verde e setas: Região de anelamento dos primers externos.

Figura 5: Esquema representativo da ORF2 de PCV2 mostrando as regiões de anelamento dos primers externos específicos para o PCV2 (em verde) e as sequências específicas dos subtipos PCV2a e PCV2b (em amarelo).

5. Resultados

5.1. *Nested-PCR em tubo único (STNPCR)*

Para a STNPCR, optou-se por usar as concentrações dos *primers* externos e internos de 0,04 μ M e 0,4 μ M, respectivamente. Enquanto que as temperaturas de anelamento foram padronizadas sendo de 60°C e 62°C, respectivamente, e os números de ciclos 15 e 45 nos 1º e 2ª estágios. O desenvolvimento da STNPCR resultou em amplificação do produto esperado de 225 pb relativo ao PCV2 (Figura 6). Na aplicação clínica, a STNPCR foi capaz de detectar o PCV2 em 100% das amostras analisadas (Figura 7), posteriormente confirmadas pelo sequenciamento.

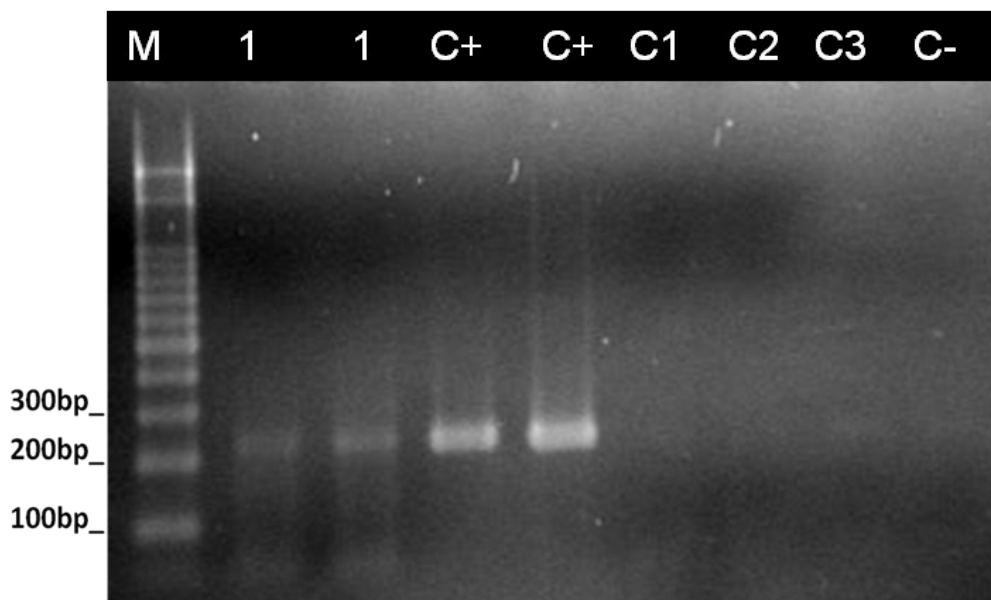


Figura 6: Desenvolvimento da STNPCR. M: 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec); duplicata1: amostra clínica; duplicata C+: controle positivo de referência; C1: controle negativo de referência (animal SPF); C2: células negativas (SK6), C3: células SK6 positivas para o PVC1, e C- controle negativo de reação (água).

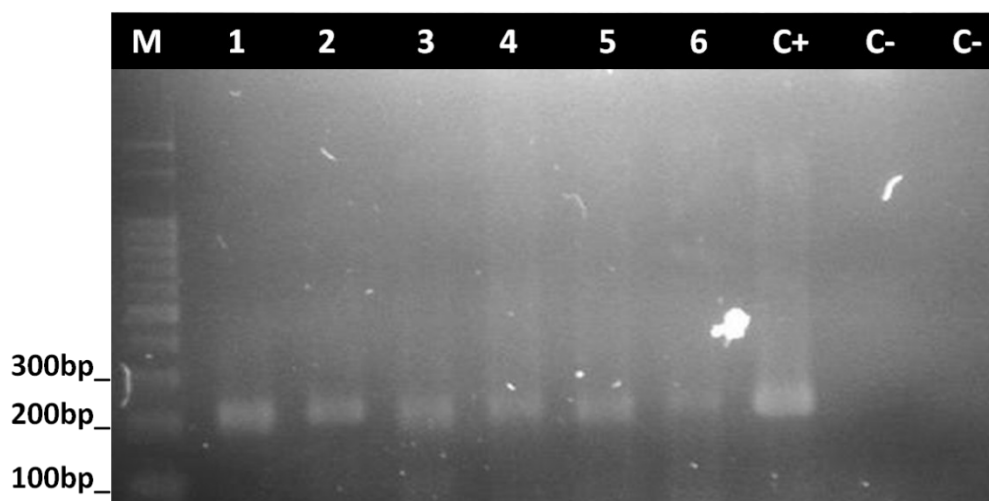


Figura 7: Gel representativo da STNPCR na detecção do PCV2 em amostras clínicas. M: 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec); Canaletas 1-6: amostras clínicas; C+: controle positivo de referência; C-: controle negativo de referência (animal SPF), C-: controle negativo de reação (água).

5.2. Ensaio de sensibilidade e especificidade

A STNPCR e NPCR descritas tiveram sensibilidade de $2,5 \times 10^4$ cópias de DNA, enquanto que a PCR convencional apresentou $2,5 \times 10^5$ cópias de DNA. Na comparação com a PCR convencional, a STNPCR foi 10 vezes mais sensível (Figura 8).

Os ensaios permitiram a verificação dos resultados positivos e negativos, bem como a ausência de reações inespecíficas. O sequenciamento confirmou a positividade das amostras. A especificidade dos *primers* foi avaliada com a utilização dos controles negativos e positivos, os *primers* utilizados foram específicos ao PCV2, pois não ocorreu contaminação cruzada nas reações. Para

avaliação da especificidade dos *primers* com relação a outros patógenos suínos, já tinha sido avaliada por Kim *et al.*, 2001.

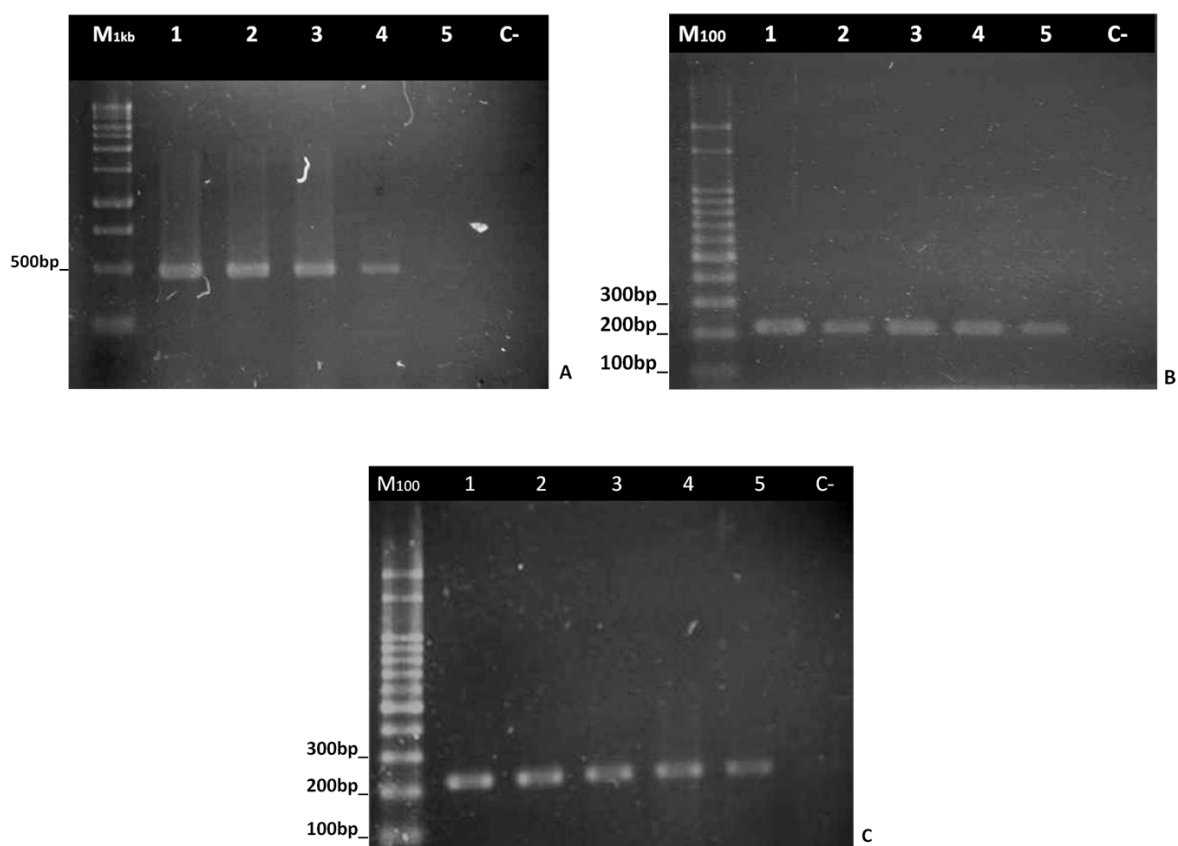


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR (A), NPCR (B) e STNPCR (C). Canaletas 1 a 5: Gama de diluição do controle positivo de referência 2.5×10^8 a $2,5 \times 10^4$ cópias de DNA. M_{1kb} - 1 kb DNA ladder (Promega); M₁₀₀ - 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec); C-: controle negativo de reação (água).

5.3. Aplicação clínica

Na aplicação clínica, a PCR convencional foi capaz de detectar 67% das amostras positivas, enquanto que a NPCR e STNPCR identificou 100% das amostras como positivas (Tabela 1).

Tabela 1: Detecção do DNA de PCV2 em amostras clínicas utilizando as técnicas de PCR, NPCR e STNPCR.

Amostras	Quantidade	PCR Convencional	NPCR	STNPCR
Linfonodo inguinal	5	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)
Linfonodo	25	56% (14/25)	100% (25/25)	100% (25/25)

Mediastino				
Pulmão	25	72% (18/25)	100% (25/25)	100% (25/25)
Total	55	67% (37/55)	100% (25/25)	100% (25/25)

PCV2: *Circovírus* suíno tipo 2; NPCR: Nested-PCR; STNPCR, Nested-PCR em tubo único.

5.4. Sequenciamento e Análise Bioinformática

O resultado do sequenciamento confirmou a infecção das amostras pelo PCV2, as sequências obtidas apresentaram identidade entre 98 e 99% com as sequências virais já descritas (Quadro 3).

Quadro 3: Resultado do sequenciamento e análise bioinformática das amostras e do controle positivo de referência.

Acesso	Descrição	Score	E-value	Identidade	Query	Amostra
EU755379.1	Porcine Circovírus 2	845	0.0	99%	97%	A1
EU755379.1	Porcine Circovírus 2	843	0.0	99%	97%	A2
EU755379.1	Porcine Circovírus 2	841	0.0	99%	97%	A3
EU755379.1	Porcine Circovírus 2	841	0.0	99%	97%	A4
EU755379.1	Porcine Circovírus 2	850	0.0	99%	97%	A7
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	939	0.0	98%	100%	A5
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	924	0.0	99%	100%	A6
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	915	0.0	99%	97%	A8
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	959	0.0	99%	100%	A9
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	950	0.0	99%	100%	A10
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	937	0.0	99%	100%	A11
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	915	0.0	98%	100%	A12
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	946	0.0	99%	100%	A13
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	946	0.0	98%	100%	A14
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	948	0.0	99%	99%	A15

FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	898	0.0	98%	98%	A17
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	926	0.0	99%	98%	A19
Acesso	Descrição	Score	E-value	Identidade	Query	Amostra
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	961	0.0	99%	100%	A20
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	907	0.0	99%	98%	A21
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	953	0.0	99%	100%	A22
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	955	0.0	99%	100%	A23
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	939	0.0	98%	100%	A24
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	929	0.0	98%	99%	A25
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	917	0.0	98%	100%	A26
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	950	0.0	98%	100%	A27
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	952	0.0	99%	100%	A28
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	955	0.0	99%	100%	A29
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	937	0.0	98%	100%	A32
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	955	0.0	99%	100%	A34
FJ644930.1	Porcine Circovírus 2	918	0.0	99%	100%	A35
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	952	0.0	99%	100%	A45
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	959	0.0	99%	100%	A47
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	913	0.0	99%	99%	A50
FJ998185.1	Porcine Circovírus 2	929	0.0	98%	100%	A53
JF317579.1	Porcine Circovírus 2	961	0.0	99%	100%	C+

5.5. Estudo de Achado Técnico

A classificação das amostras de Pernambuco foi realizada com base nas sequências específicas para os subtipos PCV2a e PCV2b (Tabela 2).

Subtipo PCV2a - sequência específica AAAATC nas posições 262-267.

Subtipo PCV2b – sequências específicas CCCCCG ou CCCCTC nas posições 262-267.

Tabela 2: Classificação das amostras de PCV2 oriundas de Pernambuco com base em nucleotídeos nas posições 262-267 das sequências da ORF2.

Amostras	Sequências de Nucleotídeos (posição 262-267)	Subtipos	Clusters
A1	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A2	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A3	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A4	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A6	CCCCTC	PCV2b	1 C
A10	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A12	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A14	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A17	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A18	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A19	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A20	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A21	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A22	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A24	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A26	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A28	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A32	AAAATC	PCV2a	-
A34	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A46	AAAATC	PCV2a	-
A48	CCCCGC	PCV2b	1 A/B
A51	CCCCTC	PCV2b	1 C
Controle positivo	CCCCGC	PCV2b	1 A/B

6. Discussão

A viabilização de técnicas laboratoriais mais eficazes para a detecção do PCV2 é fundamental. A literatura reporta a identificação de sequências do DNA do PCV2 por técnicas moleculares como hibridização *in situ* e PCR (Larochelle *et al.*, 1999; Kim & Chae, 2003; Ciacci-Zanella *et al.*, 2006; Vilcek *et al.*, 2010). Neste estudo desenvolvemos e avaliamos a STNPCR para detecção do DNA do PCV2.

A STNPCR já foi desenvolvida e aplicada com sucesso para a detecção de vários patógenos dentre eles: o *Schistosoma mansoni*, a *Yersinia pestis*, o *Vibrio cholerae* e a *Salmonella* sp (Abath *et al.*, 2002; Stankecivius *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2008). O novo método preserva os princípios básicos da PCR, porém permite que as duas etapas das reações ocorram de forma independente no mesmo tubo. Esse fato é atribuído à fixação do segundo par de *primers* na parte interna da tampa do tubo (Abath *et al.*, 2002).

Picken *et al.* (1996) relataram que a principal desvantagem da NPCR é ser realizado em duas etapas, o que aumenta o risco de contaminação das amostras negativas com os produtos derivados de amplificações positivas. Abath *et al.* (2002) e Souza *et al.* (2007), evidenciaram que na STNPCR a contaminação cruzada é drasticamente reduzida, devido à fixação do segundo par de *primers* na parte interna da tampa do tubo. Essas observações foram compartilhadas com os resultados obtidos onde não foram evidenciadas contaminações cruzadas.

A otimização dos parâmetros temperaturas de anelamento, concentrações dos *primers* externos e internos bem como o número de ciclos foram fundamentados nos estudos de Souza *et al.* (2007) e Kim *et al.* (2001). Os

resultados mostraram que o consumo dos *primers* no primeiro estágio de amplificação não interferiu na cinética do segundo estágio da reação. Não foram observadas reações cruzadas nas amostras.

A técnica de STNPCR teve um limite de detecção de $2,5 \times 10^4$ cópias de DNA viral, demonstrando alta sensibilidade, enquanto que a PCR convencional obteve um sensibilidade menor de $2,5 \times 10^5$ cópias de DNA. Yang et al. (2007), comparando a PCR em tempo real e a PCR convencional, obtiveram resultados semelhantes ao nosso trabalho, onde a PCR em tempo real foi mais sensível fornecendo um limite de detecção de 1×10^3 a 1×10^{11} cópias de DNA por reação, enquanto que a PCR convencional detectou a partir de 1×10^6 cópias de DNA. Da mesma forma, Brunborg et al. (2004) relataram um limite de detecção de $1,2 \times 10^3$ cópias de DNA utilizando a PCR em tempo real.

A STNPCR apresentou sensibilidade superior quando comparada com a PCR convencional, sendo estes resultados similares aos encontrados na literatura para outros organismos (Abath *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2008). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que STNPCR e a NPCR apresentaram valores de sensibilidades iguais. Esses resultados de sensibilidade divergem dos estudos de Mendes *et al.* (2008) que encontraram maior sensibilidade para a STNPCR. Os autores Abath *et al.* (2002) e Saini *et al.* (2009) verificaram menor sensibilidade para STNPCR com relação à NPCR. Os resultados de sensibilidades obtidos por esses autores são diferentes quando comparados aos deste trabalho, possivelmente em razão, do agente em estudo, da região amplificada do genoma, protocolo de extração do DNA, método de avaliação da sensibilidade e/ ou dos reagentes utilizados (Espy *et al.*, 2006).

Essas propriedades isoladas ou associadas podem alterar o desempenho da PCR.

A especificidade da técnica foi confirmada pelo sequenciamento dos produtos amplificados a partir de amostras clínicas. Os resultados mostraram 98% e 99% de identidade para a sequência do genoma PCV2 depositadas no *GenBank*. Além disso, usamos tecidos de suínos SPF e DNA de célula de rim de suíno (SK6) para verificar possível amplificação cruzada com o genoma do suíno (Murphy *et al.*, 1995). A ausência de amplificação mostra que os *primers* utilizados no ensaio são específicos para o vírus.

A alta positividade encontrada para PCV2 nos nossos resultados é sustentada por Larochelle *et al.* (1999) que analisaram 42 amostras de tecidos por multiplex-PCR e encontraram 40 amostras positivas para PCV2. Opriessnig *et al.* (2004) relataram que o PCV2 é considerado comum na população de suínos. Barbosa *et al.* (2008) verificaram que a infecção pelo PCV2 pode estar disseminada em suínos criados intensivamente sem a ocorrência dos sinais clínicos da PMWS.

Além da sensibilidade e especificidade, a STNPCR é um procedimento simples e prático. Mendes *et al.* (2008), verificaram que após preparação dos tubos, estes podem ser armazenados por cinco meses à temperatura de -20°C. Soma-se ao fato que a STNPCR poder ser realizada em laboratórios com o mínimo de equipamentos de biologia molecular.

A classificação genética das amostras no estado de Pernambuco, a partir do estudo de achado técnico, corrobora com os achados do Brasil, onde já foram relatados os subtipos PCV2a e PCV2b, com maior prevalência para o subtipo

PCV2b (Ciacci-Zanella *et al.*, 2009). Assim como, nos diversos países que foram realizados estudos de filogenia, a maioria dos estudos baseia-se na caracterização dos subtipos PCV2a e PCV2b sugerindo o PCV2b como subtipo mais patogênico que o PCV2a e mais predominante em rebanhos afetados pela PMWS (Trible & Rowland, 2012). Inclusive outros subtipos foram encontrados, como o PCV2c relatado na Dinamarca (Dupont *et al.*, 2008) e o PCV2d foi bem relatado na China (Guo *et al.*, 2010) e o mais novo subtipo PCV2e encontrado na Tailândia (Jantafong *et al.*, 2011).

7. Conclusões

A STNPCR desenvolvida se mostrou eficaz para a detecção do DNA do PCV2 em amostras clínicas. A alta sensibilidade e especificidade aliada à alta confiabilidade dos resultados fazem do método adequado para investigações epidemiológicas do PCV2 e pode auxiliar no diagnóstico laboratorial da PMWS.

Como o PCV2 é um grande problema para suinocultura industrial, o desenvolvimento desse método alternativo e o estudo de achado técnico foram importantes, onde se obteve uma caracterização viral da propriedade comercial de suínos. Isso traz consequências positivas para obtenção de medidas de controle efetivo e diminuição das perdas econômicas para os produtores.

8. Referências Bibliográficas

Abath FGC, Melo FL, Werkhauser R P, Montenegro L, Montenegro R and Schindler HC (2002) Single-tube Nested-PCR using immobilized internal primers. *Bio Techniques* 33: 1210-1214.

Allan GM, Phenix K, Todd D and McNulty M (1994) Some biological and physico-chemical properties of porcine Circovirus. *Journal of Veterinary Medicine B* 41:17–26.

Allan GM and Ellis J (2000) Porcine Circovirus: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:3-14.

Baekbo P, Kristensen CS and Larsen LE (2012) Porcine Circovirus diseases: A review of PMWS. *Transbound. Emerg. Dis.* 59:60–67.

Barbosa CN e Freitas TRP (2008) Implementação da técnica de imunohistoquímica (IHQ) para o diagnóstico do circovírus suíno tipo-2 (CVS-2). *Revista Ciências Médicas e Biológicas* 7:211-219.

Barbosa CN, Lobato ZIP e Martins NRS (2008) Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60(4):815-820.

Brunborg IM, Modal T and Jonassen CM (2004) Quantitation of porcine Circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs

with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. J Virol Methods 122:171–178.

Castro AMMG, Cortez MB, Heinemann P, Brandão LJ e Richtzenhain T (2007) Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). In: Arquivos do Instituto Biológico. USP, São Paulo, 74(3):281-291.

Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR and Dunham AG (2007) Detection of two porcine Circovírus type 2 genotypic groups in United States swine herds. Archives of Virology 152(5):1035-1044.

Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL and Mittal SK (2002) Sequence analysis of old and new strains of porcine Circovírus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome. Canadian Journal of Veterinary Research 66:217-224.

Ciacchi-Zanella JR e Morés N (2003) PCVD. In: Circular Técnica 37. EMBRAPA/CNPQA, Concórdia, Santa Catarina, pp1-12.

Ciacchi-Zanella JR, Morés N, Simon NL, Oliveira SR e Gava D (2006) Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. Ciência Rural 36(5):1480-1485.

Ciacci-Zanella JR, Simon NL, Pinto LS, Viancelli A, Fernandes LT, Havashi M, Dellagostin AO e Esteves PA (2009) Detecção de *Circovírus* suíno tipo 2 (PCV2) variantes PCV2-1 e PCV2-2 na população de suínos do Brasil. *Res Vet Sci* 87(1):157-160.

Clark EG (1997) Post weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. American Association of Swine Pract* 28:499-501.

Darwich L, Segalés J and Mateu E (2004) Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by *Porcine Circovírus 2*: an immune riddle. *Archives of Virology* 149:857–874.

Dulac G and Afshar A (1989) Porcine Circovírus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to Circovírus in Canadian pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53:431–433.

Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE (2008) Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128:56-64.

Dvorak CMT, Puvanendiran S and Murtaugh MP (2013) Cellular pathogenesis of porcine Circovírus type 2 infection. *Virus Research* 174:60–68.

Edwards S and Sands J (1994) Evidence of porcine Circovírus infection in British pigs. *Veterinary Record* 134:680–681.

Ellis J, Haines DM, Adair BM and Allan GM (1999) A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine Circovírus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods* 80:123-128.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A suinocultura no Brasil. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=19>. Acesso em: 12 mar. 2013.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR and Smith TF (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev* 19:165–256.

Fan H, Ju C, Tong T, Huang H, Lv J and Chen H (2007) Immunogenicity of Empty Capsids of Porcine Circovírus Type 2 Produced in Insect cells. *Vet Res Commun* 31:487-496.

Finsterbusch T and Mankertz A (2009) Porcine Circovíruses - small but powerful. *Virus research* 143(2):177-183.

Flores EF (2007) *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 888p.

Gao Z, Dong Q, Jiang Y, Opriessnig T, Wang J, Quan Y and Yang Z (2013) Identification and characterization of two novel transcription units of porcine Circovirus 2. *Virus Genes* 47:268-275.

Garcia WB (2008) PCVD, 26p. Monografia (especialização) – Universidade Castelo Branco, Campo Grande – MS.

Grau-Roma L, Fraile L and Segalés J (2011) Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine Circovirus type 2. *The Veterinary Journal* 187: 23–32.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP and LIU CM (2010) Porcine Circovirus type 2 (PCV2); genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal* 7:273-284.

Hamel AL, Lin LL and Nayar GPS (1998) Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *Journal of Virology* 72(6):5262 - 5267.

Harding JCS, Clark EG, Strokappe JH, Willson PI and Ellis JA (1998) Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Journal of Swine Health and Production* 6:249-254.

Jantafong T, Boonsoongnern A, Poolperm P, Urairong K, Lekcharoensuk C and Lekcharoensuk P (2011) Genetic characterization of porcine Circovirus type 2 in

piglets from PMWS-affected and-negative farms in Thailand. *Virology Journal* 8:88.

Kekarainen T, Mcculloughb K, Forta M, Fossumc C, Segalés J and Allane GM (2010) Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine Circovirus type 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136:185–193.

Kim J, Han DU, Choi C and Chae C (2001) Differentiation of porcine Circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 98:25-31.

Kim J and Chae C (2003) Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine Circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research* 67:133–137.

Larochelle R, Antaya M, Morin M and Magar R (1999) Typing of porcine Circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods* 80:69-75.

Larochelle R, Magar R and D'allaire S (2003) Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research* 67:114-120.

Madec F, Eveno E, Morvan P, Hamon L, Blanchard P, Cariolet R, Amenna N, Morvan H, Truong C, Mahé D, Albina E and Jestin A (2000) Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observation

from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science* 63(3):223-233.

Magar R et. al. (2000) Retrospective serological survey of antibodies to porcine Circovirus type 1 and type 2. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64(3):184-186.

Meehan BM, Mcneilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM and Allan GM (1998) Characterization of novel Circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 79:2171– 2179.

Mendes CL, Abath FGC and Leal NC (2008) Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. *J.Microbiol. Methods* 72:191–196.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, and Summers, MD (1995) The Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*. Springer Verlag, New York, pp586.

Nascimento JAFB (2009) Análise Filogenética do Circovirus Suíno Tipo 2 no Brasil. Tese apresentada a Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

Olvera A, Cortey M and Segales J (2007) Molecular evolution of porcine Circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357:175-185.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng X-J and Halbur PG (2004) Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine Circovirus type 2. *Vet. Pathol.* Online 41:624–640.

Opriessnig T, Meng XJ and Halbur PG (2007) Porcine Circovirus Type 2 Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies DOI: 10.1177/104063870701900601 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(6):591-615.

Opriessnig T, Xiao C-T, Gerber PF and Halbur PG (2013) Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Veterinary Microbiology* 163:177–183.

Picken MM, Picken RN, Han D, Cheng Y and Strle F (1996) Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 15:489–498.

Royer RL, Nawagitgul P, Halbur PG and Paul PS (2001) Susceptibility of porcine Circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production* 9(6):281-284.

Rozen S and Skaletsky H (1999) Primer on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol* 132:365–386.

Saini R, Santhanam J, Othman NH, Saini D and Tang TH (2009) Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *Open Microbiol. J* 3:106–112.

Segalés J, Allan GM and Domingo M (2005a) Porcine Circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews* 6(2): 119–142.

Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A., Sibila M, Badiella L and Domingo M (2005b) Quantification of porcine Circovirus type 2 (CVS2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology* 111:223-229.

Shibata I, Okuga Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y and Hidejima I (2003) PCR detection of porcine Circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65(3):405-408.

Sorden SD (2000) Update on porcine Circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health and Production* 8(3):133-136.

Souza G, Abath FGC, Leal NC, Farias A and Almeida A (2007) Development and evaluation of a single tube nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 603:351-359.

Stankecivius A, Wasyl D, Jablonski A, Stankeviciene M and Pejsak Z (2006) One-tube nested PCR the detection of *Salmonella* sp. in swine faeces. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50:35-3.

Tischer I, Rasch R and Tochtermann G (1974) Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Abt.1 Originale A* 226:153-167.

Tischer I, Mielsch W, Wolff D, Vagt M and Griem W (1986) Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine Circovirus. *Archives of Virology* 91:271–276.

Todd D (2000) Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: A review. *Avian Pathology* 29:5, 373-394.

Tribble BR and Rowland RRR (2012) Genetic variation of porcine Circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research* 164: 68-77.

Vilcek S, Vlasakova M and Jackova A (2010) LUX real-time PCR assay for the detection of porcine Circovirus type 2. *Journal of General Virology* 165:216-221.

Yang Z, Mudasser H, Jiang-bing S and Wei-huan F (2007) Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. Zhejiang Univ. Sci. B. 8:162–169.

Zanella JRC and Mores N (2000) Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memoria...** Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, P.EIP16.

Zanella CJR, Mores N, Schiochet MF and Trombetta C (2001) Diagnóstico molecular e caracterização do Circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. Anais da Abraves, Porto Alegre, RS, p97-98.

Zheng L-l, Wang Y-b, Li M-f, Chen H-y , Guo X-p, Geng J-w, Wang Z-y, Wei Z-y and Cui B-a (2013) Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine Circovírus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. Journal of Virological Methods 187:15-19.

9. Anexos

Publicação de Artigo Científico:

Pontes NE, Barbosa CN, Jesus ALS, Silva JG e Freitas AC (2012)
Development and Evaluation of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the
Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). Transboundary and Emerging
Diseases (Print) **JCR**.

Article first published online: 18 OCT 2012

DOI: 10.1111/tbed.12022

10. Curriculum vitae (Lattes)

ORIGINAL ARTICLE

Development and Evaluation of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2)

N. E. Pontes¹, C. N. Barbosa^{1,2}, A. L. S. Jesus¹, J. G. Silva¹ and A. C. Freitas¹

¹ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

² Department of Veterinary, Federal Rural University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Keywords:

Porcine circovirus type 2; Single-tube nested PCR; Swine

Correspondence:

A. C. Freitas, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Tel.: +55 81 21268569;

Fax: +55 81 21268512;

E-mail: antonio.freitas@pq.cnpq.br

Received for publication April 5, 2012

doi:10.1111/tbed.12022

Summary

Porcine circovirus 2 (PCV2) is a common virus in pig population and is associated with the postweaning multisystemic wasting disease (PMWS). In this study, it was developed and evaluated the single-tube nested PCR (STNPCR) method for the detection of PCV2 DNA. PCV2 reference controls and swine tissue samples were used, and primers were selected for targeting specific regions of the viral genome. In comparison of the methods, STNPCR was 10 times more sensitive than conventional PCR and showed the same sensitivity to nested PCR (NPCR), but with reduction in the risk of cross-contamination. In clinical application, 55 tissue samples were analysed by conventional PCR and resulted in 67% (37/55) of positive reactions, while the NPCR and STNPCR were able to identify the presence of viral DNA in 100% (55/55) of the samples. The high sensitivity combined with the elimination of cross-contamination makes the STNPCR method suitable for the epidemiological studies of PCV2 and can aid in the diagnosis of PMWS.

Introduction

Currently, the terminology porcine circovirus diseases (PCVD) or Porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) is used to encompass all clinical conditions associated with Porcine Circovirus type 2 (PCV2) infection. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is the most important PCVD (Allan et al., 2002; Baekbo et al., 2012) and affects pigs from 6 to 12 weeks of life (Segalés et al., 2005).

Porcine Circovirus type 2 is a non-enveloped virus whose genome consists of a single-stranded circular DNA with a size of 1700 bp. It is a member of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae* (Murphy et al., 1995). The viral genome contains three open reading frames, ORF1 encoding a replicase, ORF2 encoding the capsid protein and ORF3 encoding a protein related apoptosis (Fan et al., 2007; Vilcek et al., 2010).

Serological data show that PCV2 infection is common in the swine and wild boars populations worldwide. In several

European and American countries, PCV2 infection is widespread in commercial swine and can occur in herds affected and unaffected by the PMWS (Opriessnig et al., 2004; Barbosa et al., 2008).

The PMWS diagnosis is complex and should be based on criteria such as individual and collective clinical signs, pathological lesions and histopathological characteristics of the disease and the presence of PCV2 (Segalés et al., 2005; Barbosa and Freitas, 2008). The identification of PCV2 can be performed by laboratory techniques, among them are the virus isolation, identification of viral proteins by immunohistochemistry and the viral genome detection by *in situ* hybridization, PCR and real-time PCR (Ellis et al., 1999; Kim and Chae, 2003; Brunborg et al., 2004; Segalés et al., 2005; Yang et al., 2007; Ogawa et al., 2009; Vilcek et al., 2010).

The PCR has been used to identify PCV2 DNA sequences. Previous studies show the development of the single-tube nested PCR (STNPCR) for the detection of viral, bacterial and parasitic agents (Abath et al., 2002;

Montenegro et al., 2004; Souza et al., 2007; Saini et al., 2009). In the literature, there are no findings about the application of STNPCR for the detection of PCV2.

Therefore, the first objective of this study was to develop STNPCR for identification of PCV2 DNA. The second aim involved the application of STNPCR in 55 swine tissue samples to evaluate its diagnostic power in clinical samples.

Material and Methods

Samples

Porcine Circovirus type 2-positive sample kindly provided by MICROVET Laboratory (Minas Gerais, Brazil) was used to construct the reference-positive control. For reference-negative control, a negative sample was obtained from a Specific Pathogens Free (SPF) animal, kindly provided by EMBRAPA Swine and Poultry (Santa Catarina, Brazil). Both reference controls were obtained from inguinal lymph nodes. Negative samples were obtained from swine kidney cells (SK6) and PCV1-positive SK6 cell.

We tested 55 samples from 25 pigs at the slaughterhouses. The samples were collected from different tissues, five from inguinal lymph nodes, 25 from mediastinal lymph nodes and 25 from lungs. We emphasize that 44% of the animals had macroscopic lesions as lymphadenopathy and/or lung lesions consistent with PMWS. After collection, the samples were properly identified, packed in ice and transported to the laboratory. The tissues were fragmented and weighed to obtain 20 mg. Total DNA was extracted by commercial kit (Wizard[®] Genomic DNA Purification; Promega, Wisconsin, USA) and stored at -20°C until analysis.

Construction of reference-positive control

As positive control, we decided to use the complete PCV2 ORF2. The primers F0 (5' ATGACGTATCCAAGGAGGCG 3') and R0 (5' TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTTC 3') were designed based on the sequence of the viral genome BRA1 strain, isolated in Brazil and deposited in GenBank (accession number DQ364650.1). The computer software used was Primer3, freely available (Rozen and Skaletsky, 1999). PCV2 ORF2 was amplified by PCR from inguinal lymph nodes positive for PCV2. The expected amplified product of 700 bp was cloned into pGEM-T vector (Promega), and the construction was used to transform *Escherichia coli* DH5 α . After plasmid extraction, the recombinants were confirmed by sequencing.

STNPCR

The conventional PCR and the nested PCR (NPCR) were performed as described by Kim et al. (2001) with modifi-

cations. For the STNPCR, a pair of external (outer) primers was used: F1 (5'-CGGATATTGTAGTCCT GGT CG-3') and R1 (5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA-3'), which flanked a region of 481 bp specific for PCV2. In the second reaction, we used the pair of internal (inner) primers F2 (5'-GATTGTATGGCGGGAGGAGT-3') and R2 (5'-ATTGACGACTTTGTTCCCCC-3') that amplified a fragment of 225 bp also specific to PCV2 (Kim et al., 2001).

To standardize the reactions, the annealing temperature parameter was optimized based on the protocol of Kim et al. (2001). The temperatures tested were as follows: 60, 62 and 65°C. The other parameters were taken according to Souza et al. (2007). Briefly, the reactions were performed in a 50 μ l of reaction mixture containing 1.5 mM MgCl₂, 1 $\times$ PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP and 2 U of GoTaq[®] DNA polymerase (Promega). The concentrations of outer and inner primers were 0.04 μ M and 0.4 μ M, respectively (a ratio of 1:10). A volume containing 0.4 μ M of inner primers marked with 0.25% bromophenol blue were previously immobilized onto the microtube cap by incubating at room temperature (22°C) for 1 h and 30 min, until the cap was dry. After the primers immobilization, the reaction was prepared with the addition of 4 μ l of the positive control, reaction control (water), negative control or clinical samples to the reaction mixture.

The reaction was performed in a MJ Research PTC 200 thermocycler (Biocycler, Hangzhou, Zhejiang, China). The first round amplification consisted of 15 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. After the end of 15 cycles, the thermal cycler was stopped at a temperature of 95°C and the tubes were individually inverted for five times to elute the immobilized inner primers in the microtube cap. Immediately, the tubes were centrifuged for 30 s and replaced in a thermocycler for the second round amplification. The reaction was 45 cycles (95°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 1 min). STNPCR was ended with a final extension step at 72°C for 10 min.

Sensitivity and specificity assays

Sensitivity of PCV2 detection was estimated through serial dilutions of DNA from reference-positive control. The DNA concentration was measured with NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil). We tested the dilution range from 2.5×10^8 to 2.5×10^2 DNA copies. This procedure was performed for all PCR assays.

The specificity of the primers sets against other porcine pathogens was previously evaluated by Kim et al. (2001). However, the specificity of the primers was also tested using samples from three reference-negative controls.

Comparison of STNPCR and NPCR

To evaluate the performance of STNPCR and NPCR techniques using clinical samples, we tested DNA extracted from 55 swine clinical samples. The comparison was also performed using serial dilutions of the positive control to determine the sensitivity of the techniques.

Analysis of the products

The amplified products were submitted to electrophoresis at 100 V for 35 min in 2.0% agarose using TAE buffer followed by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and visualization under ultraviolet light.

Sequencing and bioinformatics analysis

The amplicons were sequenced using the kit ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers for sequencing were the outer primers F1 and R1. The sequences obtained were analysed by the programs BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Results

For STNPCR, we chose to use concentrations of outer and inner primers of 0.04 and 0.4 µM, respectively. The annealing temperatures were 60 and 62°C, and the number of cycles was 15 and 45 on the first and second stages, respectively.

The described STNPCR and NPCR had sensitivity of 2.5×10^4 DNA copies, whereas the conventional PCR showed 2.5×10^5 DNA copies. Compared with conventional PCR, the STNPCR was 10 times more sensitive (Fig. 1).

The products from conventional PCR were 481 bp (Fig. 2). The NPCR and STNPCR resulted in the expected amplification product of 225 bp (Fig. 3).

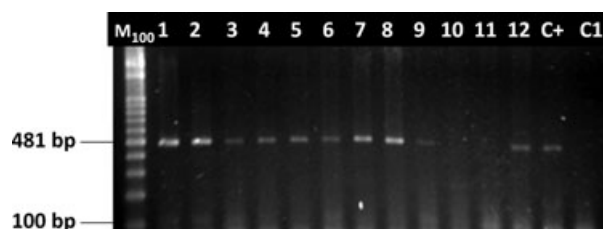


Fig. 2. Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA in clinical samples using the conventional PCR. Agarose gel electrophoresis of the amplification of PCV2 DNA using the primers F1 and R1 showing a fragment of 481 bp. M, 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec). Lanes 1–12, clinical samples. C+, reference-positive control (PCV2 open reading frames 2 (ORF2)). C1, reference-negative control (sample from SPF animal).

The evaluation of clinical samples allowed verification of positive and negative results, as well as the absence of non-specific reactions. The conventional PCR resulted in 67% (37/55) of positive reactions. The NPCR and STNPCR were able to identify the presence of viral DNA in 100% (55/55) of the samples (Table 1).

All positive samples were confirmed as PCV2 after sequencing, since the sequences obtained nucleotide identity between 98% and 99% with the viral sequences deposited in the Gene Bank database.

Discussion

The feasibility of more effective laboratory techniques for the detection of PCV2 is essential. The literature reports the identification of PCV2 DNA sequences by molecular techniques such as *in situ* hybridization and PCR (Laroche et al., 1999; Kim and Chae, 2003; Ciacci-Zanella et al., 2006; Vilcek et al., 2010). In this study, we developed and evaluated the STNPCR for the detection of PCV2 DNA.

The STNPCR have already been developed and successfully applied for the detection of various pathogens including *Schistosoma mansoni*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* and *Salmonella* sp (Abath et al., 2002; Stankevicius et al., 2006;

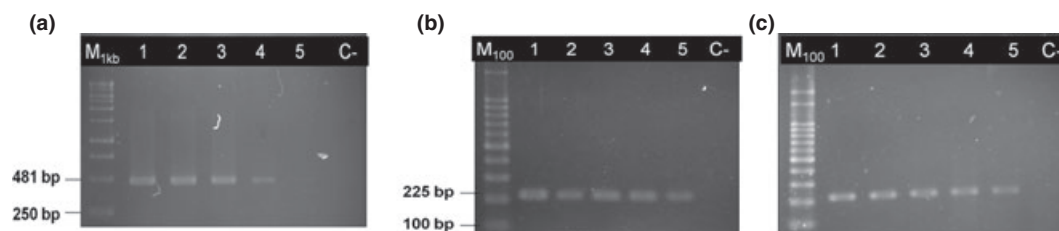


Fig. 1. Comparison of sensitivity between conventional PCR, nested PCR and single-tube nested PCR (PCR, NPCR and STNPCR). Agarose gel electrophoresis showing the amplification of a fragment of 481 bp in the conventional PCR (a) and a fragment of 225 bp in the NPCR (b) and STNPCR (c). The level of detection was evaluated from 2.5×10^8 to 2.5×10^4 DNA copies (lanes 1–5) using the PCV2 open reading frames 2 (ORF2) DNA (reference-positive control). C–, reaction control (water). M1 kb, 1 kb DNA ladder (Promega). M100, 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil).

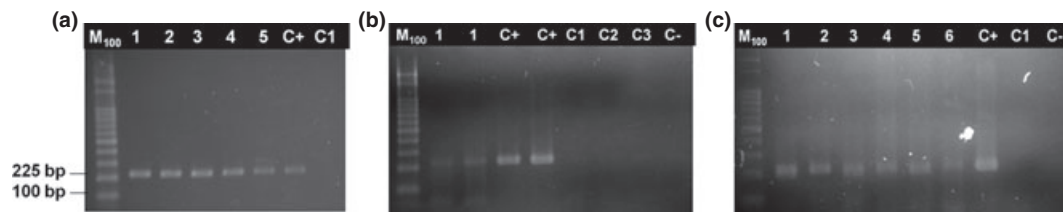


Fig. 3. Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA in clinical samples using nested PCR (NPCR) and single-tube nested PCR (STNPCR). Amplification of a fragment of 225 bp from PCV2 DNA using the primers F1 and R1 (outer) and F2 and R2 (inner). In (a), agarose gel electrophoresis from clinical samples using NPCR: Lanes 1–5, clinical samples; C+, reference-positive control (PCV2 open reading frames 2 (ORF2)); C–, reaction control (water). In (b), agarose gel electrophoresis from clinical samples using STNPCR: Lanes 1, clinical sample in duplicate; C+, reference-positive control in duplicate; C1, reference-negative control 1 (SPF animal); C2, reference-negative control 2 (SK6 cell); C3, reference-negative control 3 (PCV1-positive SK6 cell); C–, reaction control (water). M, 100 bp DNA ladder (Ludwig Biotec). In (c), agarose gel electrophoresis from clinical samples using STNPCR: Lanes 1–6, clinical samples; C+, reference-positive control (PCV2 ORF2); C1, reference-negative control 1 (SPF animal); C–, reaction control (water).

Table 1. PCV2 DNA detection in clinical samples using the conventional PCR, NPCR and STNPCR techniques

Sample	Quantity	Conventional PCR	NPCR	STNPCR
Inguinal lymph	5	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)
nodes				
Mediastinal lymph	25	56% (14/25)	100% (25/25)	100% (25/25)
nodes				
Lung	25	72% (18/25)	100% (25/25)	100% (25/25)
Total	55	67% (37/55)	100% (55/55)	100% (55/55)

PCV2, Porcine circovirus 2; NPCR, nested PCR; STNPCR, single-tube nested PCR.

Souza et al., 2007; Mendes et al., 2008). This new method preserves the basic principles of PCR, but it allows the two rounds of amplification that occur independently in the same tube. This fact is attributed to the immobilization of the second pair of primers inside the cap (Abath et al., 2002).

Picken et al. (1996) reported that the main disadvantage of NPCR is to be performed in two stages, which increases the risk of contamination of negative samples with products derived from positive specimens during the first round of amplification. Abath et al. (2002) and Souza et al. (2007) showed that in STNPCR, the cross-contamination is reduced due to fixation of the second pair of primers inside the tube cap. These observations were shared with our results where we did not detect cross-contamination.

The optimization of the annealing temperature, concentrations of external and internal primers and number of cycles were based on Kim et al. (2001) and Souza et al. (2007). The results showed that the use of primers in the first round of amplification did not affect the kinetics of

the second round. Cross-reactions have not been observed in the samples.

The STNPCR technique had a detection limit of 2.5×10^4 viral DNA copies, demonstrating high sensitivity, whereas conventional PCR showed a maximum of 2.5×10^5 DNA copies. Yang et al. (2007), comparing the real-time PCR and the conventional PCR, obtained results similar to our work, where real-time PCR was more sensitive providing a detection range of 1×10^3 to 1×10^{11} DNA copies per reaction, while the conventional PCR detected from 1×10^6 . Similarly, Brunborg et al. (2004) reported a detection limit of 1.2×10^3 viral DNA copies using real-time PCR technique.

The STNPCR showed superior sensitivity compared to conventional PCR. These results are similar to those found in the literature for other organisms (Abath et al., 2002; Souza et al., 2007; Mendes et al., 2008). In contrast, our results showed that STNPCR and NPCR sensitivity values were equal. These results differ from the sensitivity assays from Mendes et al. (2008) who found a greater sensitivity to STNPCR. Abath et al. (2002) and Saini et al. (2009) observed lower sensitivity to STNPCR in comparison with NPCR. The sensitivity results obtained by these works are different when compared with this work, possibly because of the agent in study, the amplification region of the genome, the DNA extraction protocol, the method of sensitivity evaluation and/or the reagents (Espy et al., 2006). These properties isolated or in combination can alter the performance of PCR.

The specificity of the technique was confirmed by sequencing of the amplified products from clinical samples. The results showed nucleotide identity between 98% and 99% with the PCV2 sequences deposited in the Gene Bank database. In addition, we used tissues from SPF pigs and DNA from swine kidney cell (SK6) in order to check possible cross-amplification with the porcine genome (Murphy et al., 1995). The absence of amplification shows that the

primers used in the assay are specific to the virus. The specificity of the primers against other porcine pathogens was previously demonstrated by Kim et al. (2001). We also evaluated the specificity against PCV1 using DNA from a PCV1-positive SK6 cell.

The high-positive detection rate for PCV2 found in our results is supported by Larochelle et al. (1999) who analysed 42 tissue samples by multiplex PCR and found 40 positive samples for PCV2. Opriessnig et al. (2004) reported that PCV2 is considered common in the swine population. Barbosa et al. (2008) found that PCV2 may be widespread in the pig population without the occurrence of PMWS clinical signals.

Besides the sensitivity and specificity, STNPCR is a simple and practical procedure. Mendes et al. (2008) found that after preparation of the tubes, they can be stored for 5 months at -20°C . Add to this fact, STNPCR can be performed in laboratories with minimal equipment for molecular biology.

Porcine Circovirus type 2 is still a major problem for swine industry. The development of alternative methods for their identification is essential for effective disease control and reduction of economic losses to farmers.

The developed STNPCR proved to be effective for the detection of PCV2 DNA in clinical samples. The high sensitivity and specificity combined with high reliability of the results make the method suitable for PCV2 epidemiological investigations and can help in the laboratory diagnosis of PMWS.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

NEP performed the experimental work and drafted the manuscript. CNB participated in the conception and design of the study, helped to the experimental work and to draft the manuscript. ALSJ carried out the bioinformatics analysis and to draft the manuscript; JGS participated to the experimental work and to draft the manuscript. ACF participated in the conception and design of the study and in its coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dra. Nilma Cintra Leal, Gerlane Souza and Carina Lucena Mendes from Laboratory of Microbiology, Aggeu Magalhaes Research Center; MICROVET Laboratory; Embrapa Swine and Poultry; and CNPq research agency for financial support.

References

- Abath, F. G., F. L. Melo, R. P. Werkhauser, L. Montenegro, R. Montenegro, and H. C. Schindler, 2002: Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *Biotechniques* 33, 1210–1214.
- Allan, G. M., F. McNeilly, B. Meehan, S. Kennedy, D. Johnston, J. Ellis, S. Krakowka, C. Fossum, E. Watrang, and P. Wallgren, 2002: Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Vet. Rec.* 150, 255–260.
- Baekbo, P., C. S. Kristensen, and L. E. Larsen, 2012: Porcine circovirus diseases: A review of PMWS. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 60–67.
- Barbosa, C. N., and T. R. P. Freitas, 2008: Implementação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico do circovírus suíno tipo-2 (CVS-2). *R. Cien. Méd. Biol.* 7, 211–219.
- Barbosa, C. N., Z. I. P. Lobato, N. R. S. Martins, and E. F. Nascimento, 2008: Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 815–820.
- Brunborg, I. M., T. Modal, and C. M. Jonassen, 2004: Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J. Virol. Methods* 122, 171–178.
- Ciacchi-Zanella, J. R., N. Morés, N. L. Simon, S. R. Oliveira, and D. Gava, 2006: Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Cienc. Rural* 36, 1480–1485.
- Ellis, J., D. M. Haines, B. M. Adair, and G. M. Allan, 1999: A comparison of *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods* 80, 123–128.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. C. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill III, and T. F. Smith, 2006: Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 165–256.
- Fan, H., C. Ju, T. Tong, H. Huang, J. Lv, and H. Chen, 2007: Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet. Res. Commun.* 31, 487–496.
- Kim, J., and C. Chae, 2003: Multiplex nested PCR compared with *in situ* hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67, 133–137.
- Kim, J., D. U. Han, C. Choi, and C. Chae, 2001: Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 98, 25–31.
- Larochelle, R., M. Antaya, M. Morin, and R. Magar, 1999: Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80, 69–75.

- Mendes, C. L., F. G. C. Abath, and N. C. Leal, 2008: Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. *J. Microbiol. Methods* 72, 191–196.
- Montenegro, L. M. L., R. A. Montenegro, A. S. Lima, A. B. Carvalho, H. C. Schindler, and F. G. C. Abath, 2004: Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 619–625.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, 1995: The Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol., Springer Verlag, New York, pp. 586.
- Ogawa, H., O. Taira, T. Hirai, H. Takeuchi, A. Nagao, Y. Ishikawa, K. Tuchiya, T. Nunoya, and S. Ueda, 2009: Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *J. Virol. Methods* 160, 210–214.
- Opriessnig, T., E. L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X.-J. Meng, and P. G. Halbur, 2004: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol. Online* 41, 624–640.
- Picken, M. M., R. N. Picken, D. Han, Y. Cheng, and F. Strle, 1996: Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 15, 489–498.
- Rozen, S., and H. Skaletsky, 1999: Primer on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Saini, R., J. Santhanam, N. H. Othman, D. Saini, and T. H. Tang, 2009: Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *Open Microbiol. J.* 3, 106–112.
- Segalés, J., M. Calsamiglia, A. Olvera, M. Sibila, L. Badiella, and M. Domingo, 2005: Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Microbiol.* 111, 223–229.
- Souza, G., F. G. C. Abath, N. C. Leal, A. Farias, and A. Almeida, 2007: Development and evaluation of a single tube nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. *Adv. Exp. Med. Biol.* 603, 351–359.
- Stankevicius, A., D. Wasyl, A. Jablonski, M. Stankeviciene, and Z. Pejsak, 2006: One-tube nested PCR the detection of *Salmonella* sp. in swine faeces. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50, 35–39.
- Vilcek, S., M. Vlasakova, and A. Jackova, 2010: LUX real-time PCR assay for the detection of porcine circovirus type 2. *J. Virol. Methods* 165, 216–221.
- Yang, Z., H. Mudasser, S. Jiang-bing, and F. Wei-huan, 2007: Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. *Zhejiang Univ. Sci. B.* 8, 162–169.

Nayara Evaristo de Pontes
Curriculum Vitae

Agosto/2014

Nayara Evaristo de Pontes

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Nayara Evaristo de Pontes
Filiação Ronaldo Evaristo de Pontes e Iranete Maria da Silva Pontes
Nascimento 21/07/1988 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 7198916 SDS - PE - 26/11/2002
CPF 068.920.074-90

Endereço residencial Avenida Historiador Jordão Emereciano, 249, Bloco B, apto 201
Iputinga - Recife
50800120, PE - Brasil
Telefone: 081 32744239
Celular 081 84139121

Endereço eletrônico

E-mail para contato : nayar-apontes@hotmail.com
e-mail alternativo : nayara-pontes@ig.com.br

Formação acadêmica/titulação

- 2012 - 2014** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudos Moleculares Aplicados ao circovírus suíno tipo 2: Desenvolvimento da técnica de Nested-PCR em tubo único (STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco, Ano de obtenção: 2014
Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas
Co-orientador: Dra. Clara Nilce Barbosa
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2007 - 2011** Graduação em Licenciatura plena em ciências biológicas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação profissional

1. Prefeitura Municipal de Jaboatão dos Guararapes - P JABOATÃO

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: CONTRATADO , Enquadramento funcional: PROFESSOR DE CIÊNCIAS , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Instituto Educacional São Sebastião - IESS

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor assalariado , Carga horária: 12, Regime: Parcial

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2009 - 2012 Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: estagiário bolsista , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2007 - 2009 Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: estagiário voluntário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

4. Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Assistente Administrativo , Carga horária: 30, Regime: Parcial

5. Prefeitura da Cidade do Recife - PCR

Vínculo institucional

2004 - 2006 Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Genética

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
Espanhol Compreende Pouco , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Pouco

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **PONTES, N. E.**, BARBOSA, C. N., JESUS, A. L. S., SILVA, J. G., FREITAS, A. C.
Development and Evaluation of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). Transboundary and Emerging Diseases (Print). , v.61, p.233 - 238, 2014.
2. SILVA, M.A.R., BATISTA, M.V.A., **PONTES, N.E.**, SANTOS, E.U.D., COUTINHO, L.C.A., CASTRO, R.S., BALBINO, V.Q., FREITAS, A.C.
Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. Journal of Virological Methods. , v.192, p.55 - 58, 2013.

3. SILVA, M.A.R., DE ALBUQUERQUE, B.M.F., **PONTES, N.E.**, COUTINHO, L.C.A., LEITÃO, M.C.G., REIS, M.C., CASTRO, R.S., FREITAS, A.C.

Detection and expression of Bovine papillomavirus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. Genetics and Molecular Research. , v.12, p.3150 - 3156, 2013.

4. BATISTA, MARCUS V.A., SILVA, MARIA A.R., **PONTES, NAYARA E.**, REIS, MARCIO C., CORTEGGIO, ANNUNZIATA, CASTRO, ROBERTO S., BORZACCHIELLO, GIUSEPPE, BALBINO, VALDIR Q., FREITAS, ANTONIO C.

Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. The Veterinary Journal (London, England. 1997). , v.197, p.368 - 373, 2013.

5. SILVA, M.A.R., **PONTES, N.E.**, DA SILVA, K.M.G., GUERRA, M.M.P., FREITAS, A.C.

Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (Bos taurus). Animal Reproduction Science (Print). , v.129, p.146 - 151, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, T. L., BARRETO, E. S., **PONTES, N. E.**, NASCIMENTO, E. E. G., NASCIMENTO, A. R.

A educação ambiental nas aulas de ciências In: I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas, 2011, Recife.

I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas. , 2011.

2. **PONTES, N. E.**, ALBUQUERQUE, D. F., SILVA, C. H., NASCIMENTO, A. R., ALMEIDA, A. V.

Abordagem dos insetos nos livros didáticos de ciências do ensino fundamental In: I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas, 2011, Recife.

I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas. , 2011.

3. ALBUQUERQUE, D. F., SILVA, C. H., SILVA, R., NASCIMENTO, A. R., **PONTES, N. E.**

Análise de atividades práticas no ensino da botânica nos livros didáticos de biologia In: I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas, 2011, Recife.

I Mostra do Laboratório de Ensino das Ciências Biológicas. , 2011.

4. **PONTES, N. E.**, BARBOSA, C. N., JESUS, A. L. S., SILVA, J. G., FREITAS, A. C.

DEVELOPMENT OF SINGLE-TUBE NESTED-PCR FOR PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 DETECTION IN CLINICAL SAMPLES In: XXII Encontro Nacional de Virologia/ VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.

XXII Encontro Nacional de Virologia/ VI Encontro de Virologia do Mercosul. , 2011.

5. ALBUQUERQUE, D. F., SILVA, C. H., SILVA, R., **PONTES, N. E.**, RIBEIRO, F. P. B.

A ABORDAGEM DE ATIVIDADES PRÁTICAS NO ENSINO DA BOTÂNICA NOS LIVROS DIDÁTICOS DE BIOLOGIA DO ENSINO MÉDIO In: Congresso Nordeste de Biólogos, 2010, Campina Grande.

Congresso Brasileiro de Biólogos. , 2010.

6. SILVA, C. H., SILVA, R., **PONTES, N. E.**, RIBEIRO, F. P. B., ALBUQUERQUE, D. F.

ANÁLISE DO CONTEÚDO PEIXES NOS LIVROS DIDÁTICOS DO ENSINO MÉDIO: UMA REFLEXÃO DA IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DE CRITÉRIOS PARA A ESCOLHA DO LIVRO DIDÁTICO In: Congresso Nordeste de Biólogos - Congrebio 2010, 2010, Campina Grande.

Congresso Nordeste de Biólogos. , 2010.

7. Lira, R.C., SILVA, M.A.R., Chagas, B.S., **PONTES, N. E.**, STOCCO, R.C., BEÇAK, W., SANTOS, J. F., FREITAS, AC

Identificação da presença do papilomavirus bovino em sêmen comercial congelado de touros (Bos Tauros). In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.

8. CARVALHO, CCR, **PONTES, N. E.**, MONTEIRO, V.L.C., COELHO, M.C.O.C., BEÇAK, W, STOCCO DOS SANTOS, RC, RIEGER, T.T., FREITAS, A. C.

Identificação de diferentes tipos de papilomavírus bovino presentes em lesões cutâneas de gado afetado por papilomatose In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.
54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **PONTES, N. E.**, BARBOSA, C. N., JESUS, A. L. S., SILVA, J. G., FREITAS, A. C.
NESTE-PCR EM TUBO ÚNICO PARA DETECÇÃO DO CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2 EM TECIDOS DE SUÍNOS In: XV Congresso da ABRAVES, 2011, Fortaleza.
XV Congresso da ABRAVES. , 2011.

2. **PONTES, N. E.**, SILVA, C. H., SILVA, R., RIBEIRO, F. P. B., ALBUQUERQUE, D. F.
Análise da Classe Insecta nos livros didáticos de ciências do ensino fundamental In: Congresso Nordestino de Biólogos, 2010, Campina Grande.
Congresso Nordestino de Biólogos. , 2010.

3. **PONTES, N. E.**, FREITAS, A. C.
DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA PARA DETECÇÃO DO CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2 BASEADA NA TÉCNICA DE PCR In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC), 2010, Recife.
XVIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (CONIC). , 2010.

4. **PONTES, N. E.**, BARBOSA, C. N., FREITAS, A. C.
Otimização e aplicação da técnica de Nested-PCR para a detecção do Circovirus suíno tipo 2 In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Recife.
X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. , 2010.

5. SILVA, C. H., SILVA, R., NASCIMENTO, A. R., MELO, C. A., RIBEIRO, F. P. B., ALBUQUERQUE, D. F.,
PONTES, N. E., GUIMARAES, W. N. R.
A abordagem de atividades práticas no ensino da botânica nos livros didáticos de biologia do ensino médio In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife.
IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. , 2009.

6. BARBOSA, C. N., **PONTES, N. E.**, JESUS, A. L. S., LIMA, E. G., FREITAS, A. C.
Detecção do Circovirus suíno tipo 1 e tipo 2 no Estado de Pernambuco utilizando a reação em cadeia da polimerase In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Ipojuca.
25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.

7. CARVALHO, CCR, **PONTES, N. E.**, RIEGER, T.T., FREITAS, A. C.
Ocorrência de infecção simultânea por diferentes tipos de papilomavirus bovino de gado afetado por papilomatose cutânea em Pernambuco In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Ipojuca.
25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.