



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DANIELLE GUIMARÃES ARAÚJO

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)
PARA DETECÇÃO DE *CIRCOVÍRUS* SUÍNO 2 NO FLUIDO ORAL DE SUÍNOS**

Recife
2019

DANIELLE GUIMARÃES ARAÚJO

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)
PARA DETECÇÃO DE *CIRCOVÍRUS* SUÍNO 2 NO FLUIDO ORAL DE SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica

Área de concentração: Fármacos,
Medicamentos e Insumos Essenciais para a
Saúde

Orientador: Dr. Antônio Carlos de Freitas

Co-orientadora: Dra. Clara Nilce Barbosa

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Araújo, Danielle Guimarães

Padronização e avaliação da Nested PCR em tubo único (STNPCR) para detecção de *Circovírus* suíno 2 no fluido oral de suínos / Danielle Guimarães Araújo. – 2019.

73 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas.

Coorientadora: Prof. Dr^a Clara Nilce Barbosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Suínos – Doenças. 2. Virose 3. Suinocultura. I. Freitas, Antonio Carlos de (Orientador). II. Barbosa, Clara Nilce (Coorientadora). III. Título.

579.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 036

DANIELLE GUIMARÃES ARAÚJO

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)
PARA DETECÇÃO DE *CIRCOVÍRUS* SUÍNO 2 NO FLUIDO ORAL DE SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 31/10/2018.

Banca Examinadora

Profº Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Presidente e Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. André Luiz Santos de Jesus (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Angélica Ramos da Silva (Examinador Externo)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes na minha vida, meus pais, por todo o incentivo e apoio incondicional, nos momentos de indecisão e nas escolhas ao longo deste caminho. Cada vitória minha os dedico com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todo o sustento, por iluminar os meus caminhos e permitir que esta oportunidade surgisse em minha vida.

Ao meu pai Severino (Duca) e minha mãe Maria Gorette, que me ensinaram todos os valores necessários para que eu pudesse realizar meus sonhos, por sempre me amarem e fizeram o possível pela minha felicidade. Vocês são o meu maior exemplo. À minha irmã Gabrielle, pelo carinho e companheirismo. À toda a minha família, que me incentivou em todos os momentos e sempre acreditou que sou capaz de grandes conquistas.

A todos os meus professores do programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica, pela competência, ética e profissionalismo. Agradeço em especial ao meu orientador, o professor Antônio Carlos de Freitas, pela confiança e oportunidade, bem como a professora Clara Nilce Barbosa, agradeço à ambos pela orientação e transmissão de conhecimentos tão essenciais nesse processo.

Ao secretário do PPGIT, Paulo, um ser humano incrível, paciente e sempre disposto a ajudar.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório Central, Marconi Rêgo e Nayara Pontes, pela disponibilidade, por cada conhecimento compartilhado e suporte em meus experimentos.

Agradeço aos meus amigos, parte fundamental em minha vida, por permanecerem ao meu lado, sempre dispostos a me ajudar nos momentos de necessidade. Agradeço em especial, ao meu grande amigo Elias Tibúrcio, meu companheiro do dia a dia, sem ele eu não estaria aqui, realizando esse sonho.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Inspiro-me na frase de Ernest Hemingway, “Não há nada nobre em ser superior ao seu semelhante. A verdadeira nobreza é ser superior ao seu antigo eu”, e, refletindo estas palavras, posso afirmar: sou melhor hoje do que era quando entrei nessa jornada.

Conquistas sem riscos são sonhos sem méritos. Ninguém é digno dos sonhos se não usar suas derrotas para cultivá-los (CURY, 2008).

RESUMO

O *Circovírus* suíno 2 (PCV2) é um agente que possui um papel importante nas perdas econômicas em granjas de suínos através da morte e queda no desempenho desses animais. A literatura cita o desenvolvimento e aplicação com êxito da Nested PCR em tubo único (STNPCR) para diagnóstico de patógenos humanos e animais, sendo a padronização desta técnica para a identificação da presença do PCV2, de grande importância para suinocultura da região. Desta forma, este trabalho teve como objetivo padronizar e avaliar a STNPCR para detectar o *Circovírus* Suíno 2 a partir de amostras de fluido oral de suínos. Para isto, foram coletadas 55 amostras de fluido oral de suínos clinicamente saudáveis. O DNA foi extraído e quantificado para realização da PCR convencional e STNCR. Para garantir a segurança e confiabilidade dos resultados, uma PCR direcionada para o gene da β -actina suína foi realizada em todas as amostras. Foram avaliadas diferentes temperaturas, concentrações de primers e número de ciclos. Todos os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese. Através dos testes para otimização das técnicas, foi possível detectar o produto esperado em ambas as reações, sendo um fragmento de 478pb na PCR direcionada ao gene da β -actina, e um fragmento de 225pb na STNPCR para detecção do PCV2. A padronização da técnica de STNPCR é uma ferramenta útil para a identificação da presença do PCV2, que pode contribuir na redução do impacto econômico que este problema representa para a suinocultura industrial.

Palavras-chave: Circovirose. Suinocultura. PCV2.

ABSTRACT

Porcine *Circovirus* 2 (PCV2) is an agent that plays an important role in economic losses in pig farms through the death and decrease in the performance of these animals. The literature cites the successful development and application of Single tube Nested PCR (STNPCR) for the diagnosis of human and animal pathogens, being the standardization of this technique to identify the presence of PCV2, of great importance for swine breeding in the region. Thus, this work aimed to standardize and evaluate the STNPCR to detect Porcine Circovirus 2 from swine oral fluid samples. For this, 55 samples of oral fluid from clinically healthy pigs were collected. DNA was extracted and quantified for the performance of standard PCR and STNCR. To ensure the safety and reliability of the results, a PCR targeted to the β -actin gene was performed on all samples. Different temperatures, primer concentrations and number of cycles were evaluated. All amplified fragments were analyzed by electrophoresis. Through the tests to optimize the techniques, it was possible to detect the expected product in both reactions, being a 478bp fragment in the PCR directed to the swine β -actin gene, and a fragment of 225bp in the STNPCR for the detection of PCV2. A standardization of the STNPCR technique is a useful tool to identify the presence of PCV2, which may contribute to reducing the economic impact of this problem for a Swine Breeding industry.

Keywords: Circovirosis. Swine Breeding. PCV2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Países em que a PCVD foi diagnosticada (Adaptado de Ségales, 2012) ..	18
Figura 2 - Estrutura do vírus de PCV2 (Protein Data Bank ID: 3R07)	22
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do PCV2 com distribuição das quatro principais ORFs (Gao et al., 2013).....	24
Quadro 1 - Manifestações clínicas da PMWS.....	29
Figura 4 - Esquema de uma reação de Nested PCR.	34
Figura 5 - Representação da técnica de Nested PCR em tubo único (Adapatado de Silva et al., 2013).....	35
Figura 6 - Mortalidade de porcos vacinados e não vacinados de acordo com meta-análise sobre o efeito da vacinação contra PCV2 (Kristensen et al, 2011).....	36
Quadro 2 - Vacinas comerciais contra PCV2 (Grau-Roma et al., 2011)	37
Figura 7 - Esquema representativo da nested-PCR em tubo único (STNPCR) (Souza et al., 2007).	43
Figura 8 - Gel representativo da PCR direcionada ao gene da β -actina suína. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); Canaletas 1-5: amostras de FO de suínos; CP: controle positivo de referência; CN: controle negativo de reação (água).....	45
Figura 9 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 2-5: amostras de FO de suínos.....	46
Figura 10 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1-3: amostras de FO de suínos.....	47
Figura 11 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1.10-3.10: amostras de FO de suínos/ 10 min no tempo de extensão; Canaletas 1.3-3.3: amostras de FO de suínos/ 3 min no tempo de extensão.....	47

Figura 12 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1-3: amostras de FO de suínos.....48

Figura 13 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1-9: amostras de FO de suínos.....49

Figura 14 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaleta 5: amostras de FO de suínos.....49

Figura 15 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); CNR: controle negativo de reação (água); G5: amostra de FO de suíno.....50

Figura 16 - Gel representativo do limite de detecção da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); Canaletas 1-5: Gama de diluição do controle positivo de referência (ORF do PCV) 2.8×10^8 a 2.8×10^4 cópias de DNA.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito das condições ambientais e dos tratamentos térmicos e químicos sobre a infectividade do PCV2 (Adaptado de López-Soria e Segalés, 2013).	25
--	----

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CTNBIO	Comissão Técnica Nacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos
FO	Fluido oral
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
NPCR	Nested PCR
ORF's	Regiões abertas de leitura (<i>Open Reading frames</i>)
ORF1	Região que codifica proteínas replicases
ORF2	Região que codifica a proteína do capsídeo viral
ORF3	Região que codifica proteína associada à apoptose
ORF4	Região com função de função na replicação viral e patogenicidade
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV1	<i>Circovírus</i> suíno 1
PCV2	<i>Circovírus</i> suíno 2
PCV2a	Genótipo do <i>Circovírus</i> suíno 2 tipo 2a
PCV2b	Genótipo do <i>Circovírus</i> suíno 2 tipo 2b
PCV3	<i>Circovírus</i> suíno 3
PCVD	Doenças associadas ao <i>Circovírus</i> suíno
OU	
PCVAD	
PDNS	Síndrome de Dermatite e Nefropatia suína
PMWS	Síndrome Multissistêmica do Definhamento de Suínos
PNP	Pneumonia Necrosante Proliferativa
PPV	Parvovírus suíno
PRDC	Doenças do Complexo Respiratório Suína

RNA _m	RNA mensageiro
RPM	Rotação por minuto
SPF	Específico livre de patógenos (<i>Specific Pathogens Free</i>)
STNPCR	Nested PCR em tubo único
TAE	Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.2 SUINOCULTURA INDUSTRIAL.....	19
2.3 HISTÓRICO DO VÍRUS	20
2.4 CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (PCV2).....	22
2.4.1 Morfologia e organização genômica.....	22
2.4.2 Propriedades biológicas e físico-químicas do vírus	25
2.4.3 Variação genética	26
3.3 SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DE SUÍNOS (PMWS).....	27
3.3.1 Manifestações clínicas.....	28
3.4 TRANSMISSÃO	29
3.5 DIAGNÓSTICO DAS SÍNDROMES ENVOLVIDAS COM AS CIRCOVIROSES SUÍNAS.....	31
3.5.1 Imuno-histoquímica e Hibridização <i>in situ</i>.....	31
3.5.2 PCR convencional e PCR em tempo real	32
3.5.3 Nested PCR.....	33
3.5.4 STNPCR.....	35
3.6 VACINAS COMERCIAIS	35
3.7 PREVENÇÃO	38
3.8 FLUIDO ORAL PARA O DIAGNÓSTICO	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	40
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	40
4.3 PRIMERS	41

4.4 PCR PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA.....	41
4.5 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO	42
4.6 NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)	42
4.7 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	44
4.8 ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 PCR PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA.....	45
5.2 NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)	45
5.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
8 PERSPECTIVAS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A - APLICAÇÃO DO MÉTODO APÓS TESTES DE OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA O PAR BETA-ACTINA EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL.	72

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma das cadeias produtivas que mais cresce no cenário da agropecuária mundial. Entretanto, a modernização e intensificação da criação de suínos aumentaram em muito o desafio de agentes infecciosos, favorecendo o surgimento de infecções como a circovirose suína (BARBOSA et al., 2011; AFOLABI et al., 2017; SEGALÉS et al., 2005).

Um patógeno bastante conhecido pelos produtores de suínos é o *Circovírus* suíno 2 (PCV2), um vírus pertencente ao gênero *Circovírus*, da família *Circoviridae*, responsável pela circovirose, uma doença multifatorial causadora de grandes prejuízos na suinocultura (ZANELLA et al., 2007; GRAU-ROMA et al., 2011; OPRIEESNIG et al., 2013).

Este agente é muito estável em condições ambientais e resistente a diferentes desinfetantes e ao calor o que dificulta a sua eliminação do ambiente. Aliado a isto, ele está presente em altas prevalências nos rebanhos mundiais, causando prejuízos por perdas de animais, condenações de carcaças bem como gastos com tratamentos principalmente de infecções secundárias, tendo em vista sua ação imunossupressora, o que evidencia a importância de se realizar estudos a respeito deste vírus, buscando direcionar uma maior atenção quanto às práticas de controle da infecção e, dessa forma, diminuir as perdas econômicas para os produtores (LÓPEZ-SORIA e SEGALÉS, 2013; NIELSEN et al., 2018).

Os registros na literatura revelam que amostras de fluido oral já foram investigadas para triagem de anticorpos e patógenos de suínos, podendo substituir as amostras de sangue em testes de diagnóstico. Nesse contexto, o método das cordas de algodão para obtenção do fluido oral (FO), torna-se uma importante ferramenta de coleta por não ser invasivo e indolor, priorizando o bem-estar do animal, minimizando o estresse ao rebanho e permitindo a coleta de material suficiente para posterior análise (ABATH et al., 2002; SOUZA et al., 2007; BARBOSA et al., 2013).

O termo circovirose suína (PCVD ou PCVAD) foi empregado para agrupar todas as doenças e síndromes associadas ao PCV2, sendo a Síndrome

Multissistêmica do Definhamento de Suínos (PMWS) considerada a principal manifestação clínica da PCVD (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; BAEKBO *et al.*, 2012).

Quanto às medidas profiláticas, estas se fundamentam na melhoria das condições de manejo que visem principalmente a higiene, a alimentação e a redução do estresse dos animais além de boas práticas visando o bem-estar animal, o que certamente reduzirá o risco do estabelecimento da circovirose (Barbosa *et al.*, 2011). Até o presente momento, quatro vacinas já foram produzidas e são baseadas em cepas do genótipo PCV2a (BAEKBO *et al.*, 2012; KEKARAINEN ET AL., 2010; PONTES *et al.*, 2014).

No que diz respeito ao diagnóstico da PCVAD, este é complexo pelo fato de haver uma multiplicidade de órgãos envolvidos, sinais clínicos inespecíficos, sistema imune comprometido e a presença de patógenos concorrentes. Dessa forma, a confirmação de que o PCV2 é o agente etiológico, baseia-se na associação de sinais clínicos e lesões macroscópicas e histopatológicas, concomitantes com a detecção de antígeno ou ácido nucléico viral. Um rebanho é considerado positivo para circovirose suína quando achados patológicos e histopatológicos indicativos estão presentes ao mesmo tempo (MORÉS *et al.*, 2007; OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

A Nested PCR em tubo único (STNPCR) tem sido desenvolvida e aplicada com êxito para diagnóstico de patógenos humanos e animais, sendo esta uma técnica com maior sensibilidade de detecção, se comparada com a PCR convencional, e com menor risco de contaminação, quando comparada com a Nested PCR convencional (ABATH *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2007).

A padronização da Nested PCR em tubo único (STNPCR) para detecção de *Circovírus* suíno 2 no fluído oral de suínos pode ser de grande importância para a suinocultura da região, e através dos resultados obtidos, pode-se auxiliar no entendimento do papel do vírus no desenvolvimento de síndromes no animal infectado e contribuir para a adoção de possíveis medidas profiláticas e terapêuticas que possam vir a ser tomadas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo padronizar e avaliar a Nested PCR em tubo único (STNPCR) para detecção de *Circovírus* suíno 2 no fluído oral de suínos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Conforme estudo realizado por Ségales et al. (2012), anticorpos para PCV2 foram encontrados em suínos de todos os continentes (Figura 2), o que evidencia que o PCV2 é um vírus ubíquo a nível mundial. A circovirose suína é, atualmente, considerada uma doença endêmica com alto impacto econômico na maioria dos países produtores de carne suína.

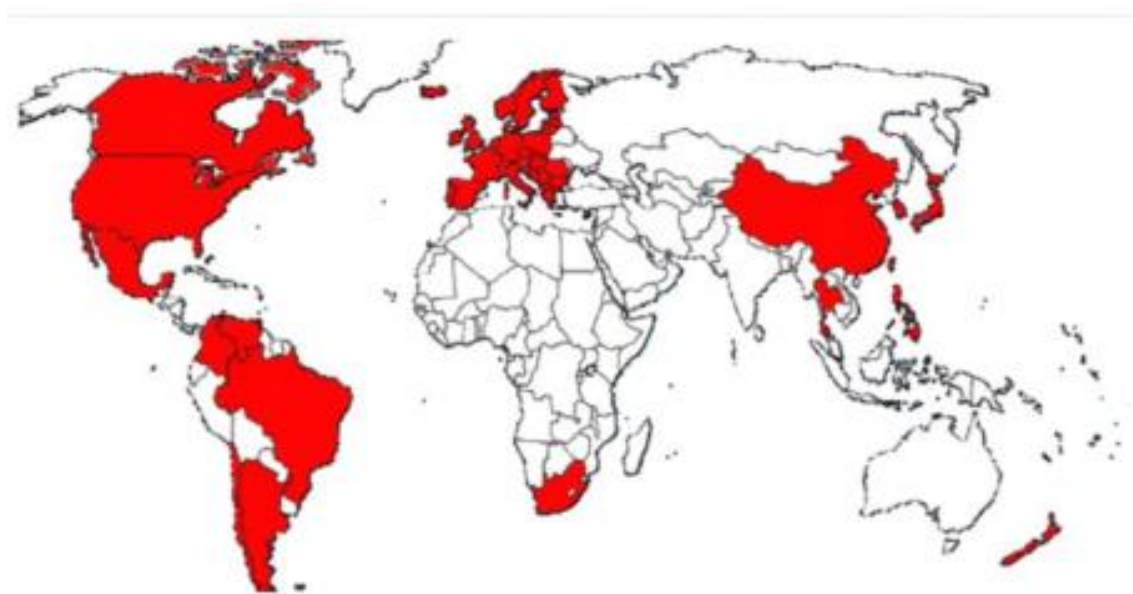


Figura 1 - Países em que a PCVD foi diagnosticada (Adaptado de Ségales, 2012).

Os primeiros surtos epidêmicos de doença ocorreram no Canadá em meados de 1990 (HARDING, 1998), na Europa em 1997 (Espanha e França) (SEGALÉS et al., 1997), e no continente Asiático entre 1997 e 1999 (Japão, Taiwan, Tailândia) (CHOI, CHAE e CLARK, 2000). Na Nova Zelândia foram confirmados no mesmo ano os primeiros casos de PMWS (STONE, 2004), enquanto nos Estados Unidos da América foram confirmados em 2004 e 2005 (CARMAN et al., 2006). Na Austrália demonstrou-se a presença de PCV2, sem, no entanto, serem relatados casos de PMWS (DUPONT et al, 2008). Em Portugal, o primeiro caso de PMWS ocorreu em 2000. Na Argentina, os primeiros surtos de PMWS ocorreram em 2002 (ARIEL et al., 2011).

No Brasil a doença foi primeiro relatada em Santa Catarina, no ano de 2000 (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003). Posteriormente, diversos estudos foram realizados e detectaram a presença do vírus nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e Pernambuco (PESCADOR et al., 2003; CASTRO et al., 2003; PINTO et al., 2003; CHIARELLI-NETO et al., 2005; FRANÇA et al., 2005; CHIARELLI-NETO et al., 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2009; PONTES et al., 2014).

2.2 SUINOCULTURA INDUSTRIAL

A carne suína é a mais consumida no mundo, com uma produção de mais de 100 milhões de toneladas por ano. No cenário produtivo mundial da suinocultura alguns países destacam-se pelo seu volume produzido, consumido e exportado, onde metade é produzido pela China, e outro terço na União Europeia e Estados Unidos. Neste panorama, o Brasil ocupa a quarta colocação, com 3,2% da produção (SOUZA et al, 2011; GASTARDELO e MELZ, 2014; USDA, 2016; ABPA, 2017).

A relevância da suinocultura vem da crescente demanda nacional e internacional, que torna a exportação de carne suína um dos nichos que mais tem crescido nos últimos anos. Nesse âmbito, observa-se, uma grande variedade de formas organizacionais, que vão desde pequenos produtores independentes, com fornecimento caseiro e consumo local, até infraestruturas agrícolas com integração vertical, que vendem em bases nacionais e internacionais (RODRIGUES et al., 2009; GASTARDELO e MELZ, 2014).

Vale ressaltar também que a cadeia produtiva de carne suína não é a única a atuar neste setor. Diversos atores e atividades circulam em torno da suinocultura, desde o produtor de grãos e as fábricas de rações, passando pelas agroindústrias de abate e processamento, até o segmento de equipamentos, medicamentos, distribuição e o consumidor final. No Brasil, essas atividades e seus encadeamentos produtivos contribuem para o crescimento das regiões onde estão situados os principais polos suinícolas (SOUZA et al, 2011).

Outro ponto a se destacar, é o fato de que concomitante ao crescente aumento do setor, se faz necessário o investimento em melhoramento genético, instalações, manejo, nutrição e programas de vacinação. Entretanto, as mudanças causadas pela tecnificação do sistema de produção, principalmente a adoção de sistemas de criação intensivos, aumentaram a pressão e o nível de estresse para os animais, o que acaba proporcionando maiores desafios sanitários e consequente predisposição à microrganismos e doenças (SEGALÉS et al., 2005; VAZ, 2009).

2.3 HISTÓRICO DO VÍRUS

O Circovírus Suíno (PCV) foi relatado primeiramente na Alemanha em 1974, por meio da microscopia eletrônica, ao observar um vírus morfologicamente semelhante a um *picornavirus*, que causava infecção persistente em cultivo celular de rim suíno (PK-15) sem induzir efeito citopático (TISCHER et al., 1974).

Posteriormente, na década de 80, foi demonstrado, por Tischer e colaboradores (1982), que esse vírus possuía um genoma composto por um filamento único de DNA de fita simples, circular e fechado, razão pela qual o denominaram de *Circovírus* suíno (CASTRO et al., 2007; YANG et al., 2007).

Em 1991, no Canadá, ocorreu um surto que causava emagrecimento progressivo, alterações respiratórias, palidez, icterícia e extensas lesões nos tecidos linfóides dos animais acometidos, a enfermidade até então desconhecida, foi descrita em 1996 como Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (PMWS) (CLARK, 1997; FRANÇA et al. 2005). Imediatamente diversos outros autores confirmaram essas observações, principalmente na América do Norte, Europa e Ásia (ALLAN et al. 1994, HARDING et al. 1998, MEEHAN et al. 1998, MOROZOV et al. 1998, ELLIS et al. 1999, CHOI et al. 2002).

Além da PMWS, o PCV2 tem sido associado a outras doenças, como a síndrome de Dermatite e Nefropatia suína (PDNS), falhas reprodutivas, Enterite associada ao PCV2, Pneumonia Necrosante Proliferativa (PNP) e Doenças do Complexo Respiratório Suína (PRDC). O termo circovirose suína (PCVD ou PCVAD) foi

empregado para agrupar todas as doenças e síndromes associadas ao PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2007).

Estudos genéticos realizados em isolados de animais acometidos com essa síndrome nos Estados Unidos, França e Canadá, quando comparados com o PCV encontrado nos anos 70, verificaram uma similaridade menor que 80% sugerindo a existência de uma nova variante do vírus (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998). Diante disto, o PCV foi dividido em dois tipos: o *Circovírus* considerado não patogênico, derivado da célula PK-15, foi denominado de *Circovírus* suíno 1 (PCV1) e o *Circovírus* associado aos sinais clínicos de suínos acometidos pela PMWS, foi denominado *Circovírus* suíno 2 (PCV2).

No ano de 2016, um novo tipo de circovírus, cuja patogênese ainda está sendo elucidada, foi identificado nos Estados Unidos em suínos que morreram agudamente com sinais clínicos da síndrome de dermatite e nefropatia suína (PDNS). Posteriormente, observou-se que este vírus, que foi denominado *Circovírus* Suíno 3 (PCV3), estava presente em rebanhos na China, Reino Unido, Itália, Polônia, e Coreia do Sul, associado a falhas reprodutivas, tremor congênito, doença respiratória e inflamação multissistêmica (STADEJEK et al., 2017; FUX et al., 2018; KEDKOVID et al., 2018). Além disso, dois genomas brasileiros de PCV3 foram depositados no GenBank, confirmando que ele também circula no Brasil (SARAIVA et al., 2018).

Em relação ao Brasil, a PMWS foi diagnosticada pela primeira vez em 2000, no Estado de Santa Catarina, porém estudos retrospectivos de tecidos de suínos estocados em blocos de parafina confirmaram a presença do vírus através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em materiais arquivados desde 1988, sugerindo que a infecção já estava presente anteriormente no país (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003; CIACCI-ZANELLA et al., 2006). 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 no cenário da suinocultura brasileira (CIACCI-ZANELLA et al., 2001; BARBOSA et al. 2008).

Nos últimos anos, o crescimento da suinocultura como atividade econômica culminou no fortalecimento de um sistema de produção intensiva, com rebanhos cada vez maiores em áreas restritas. Em contrapartida, estes precursores que visam a atender a lucratividade em um mercado internacional cada vez mais competitivo podem agravar o estresse animal e, conseqüentemente, os deixando mais suscetíveis à ocorrência de várias doenças, entre elas, a circovirose suína (BARBOSA et al., 2011).

2.4 CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (PCV2)

2.4.1 Morfologia e organização genômica

O Circovírus suíno do tipo 2 (PCV2) é um vírus pertencente ao gênero *Circovírus*, da família Circoviridae. Trata-se de um vírus pequeno de aproximadamente 1.76 kb, com 17 nm de diâmetro, não-envelopado, icosaédrico e com genoma circular de fita única (Figura 2) (CHOI et al., 2002; NASCIMENTO, 2009; GRAU-ROMA et al., 2011; OPRIESSNIG et al., 2013).

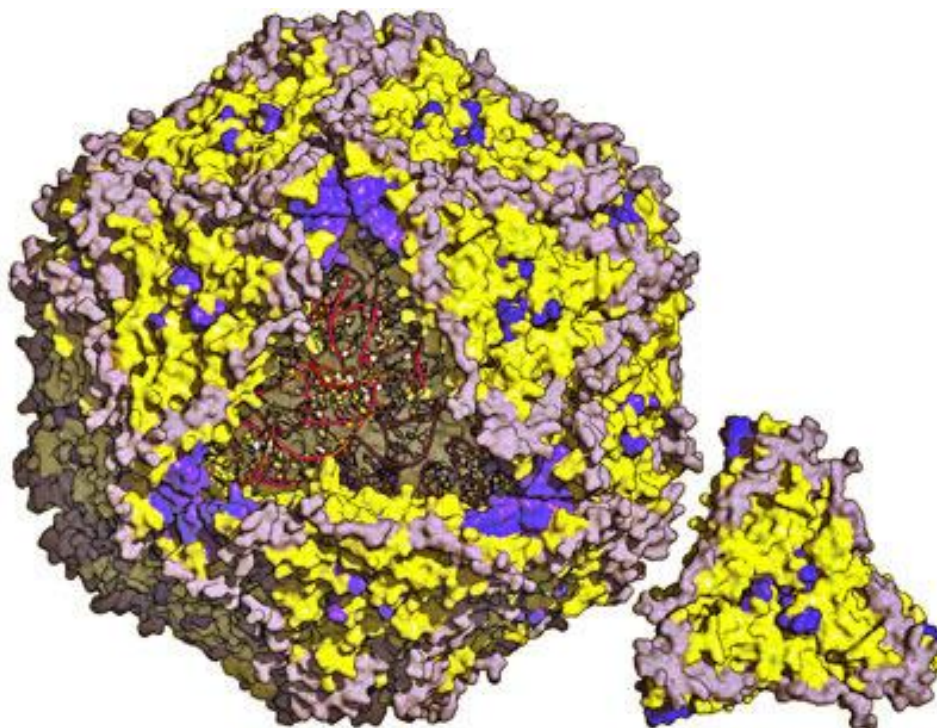


Figura 2 - Estrutura do vírus de PCV2 (Protein Data Bank ID: 3R07).

Existem várias pequenas inserções e deleções localizadas em toda a extensão do genoma do DNA viral que parecem ser responsáveis pelas diferenças de patogenicidade entre os tipos de PCV. Foram sugeridos 11 ORFs (“open reading frames” – regiões abertas de leitura) no genoma, porém apenas ORF1 e ORF2 são expressas em ambos os vírus, PCV1, PCV2 e PV3 (LIU, et al., 2006; SARAIVA et al., 2018).

O genoma do PCV2 possui 1768 nucleotídeos e é composto por quatro principais ORFs. A ORF1, também conhecido por gene Rep, codifica as proteínas replicases não estruturais Rep e Rep', importantes na replicação viral. Esta, localiza-se no filamento positivo (5' - 3'), orientado no sentido horário, e se estende do nucleotídeo 51 aos 995. A ORF2, ou gene Cap, codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo viral. A síntese desta proteína ocorre após a infecção da célula pelo agente através de enzimas codificadas pelo hospedeiro. A ORF2 localiza-se no filamento negativo (3' – 5'), orientado no sentido anti-horário, e se estende do nucleotídeo 1735 aos 1034. A ORF3 codifica uma proteína não estrutural de 105 aa de comprimento. A proteína ORF3 está implicada no apoptose das células PK15, pela ativação da rota iniciador caspase-8 e efetor caspase 3. Essa região se estende do nucleotídeo 671 aos 357. A ORF4, mais recentemente identificada, tem função na replicação viral e patogenicidade, estendendo-se do nucleotídeo 565 aos 386. A ORF3 e a ORF4 estão sobrepostas ao gene ORF1, e localizam-se no filamento negativo (3' – 5'), orientado no sentido anti-horário (Figura 3) (MANKERTZ et al., 2004; LIU et al., 2006; PONTES et al., 2014; FERNANDES, 2017).

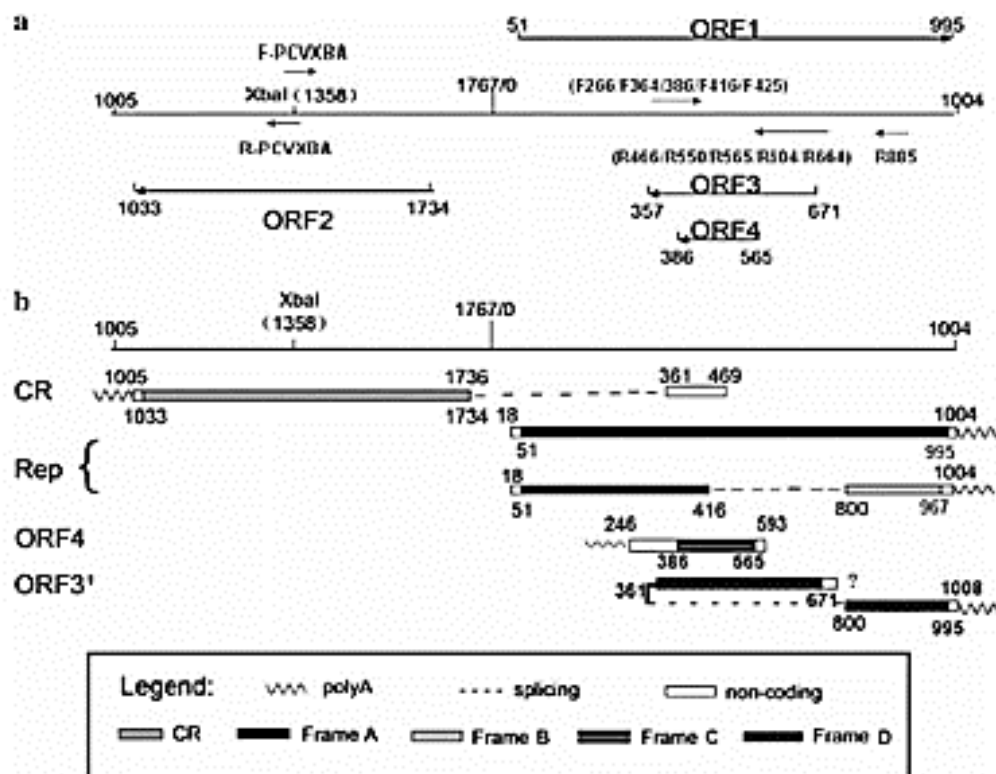


Figura 3 - Representação esquemática do genoma do PCV2 com distribuição das quatro principais ORFs (Gao et al., 2013).

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 (síntese de DNA) do ciclo celular. A replicação do genoma viral ocorre em três etapas. Na primeira ocorre conversão do DNA de fita simples em formas replicativas de fita dupla (replicativo intermediário), a partir da fita molde. Na segunda etapa, após a síntese do replicativo intermediário, ocorre a amplificação destas formas replicativas pelo mecanismo de círculo rolante, possivelmente, sendo mediado pela replicase rep. 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. Na terceira etapa, essas moléculas são encapsuladas por múltiplas cópias da proteína do capsídeo. A morfogênese ocorre no núcleo por mecanismos ainda não esclarecidos (NASCIMENTO, 2009; PONTES et al., 2014).

2.4.2 Propriedades biológicas e físico-químicas do vírus

O PCV2 tem afinidade por células do sistema fagocitário mononuclear e podem ser detectados em diversos tecidos e órgãos, tais como os pulmões, amígdalas, gânglios linfáticos, timo, baço, intestino, rim, fígado, soro, glândulas salivares, testículos e secreções nasais (LAROCHELLE et al., 1999).

O PCV2 é altamente contagioso e permanece estável em fezes e secreções respiratórias. Trata-se de um vírus muito constante em condições ambientais, é resistente à inativação quando exposto ao ambiente ácido (pH 3), ao clorofórmio, a temperaturas entre 56°C e 70°C, ao congelamento, à luz ultravioleta e a diferentes desinfetantes, o que dificulta a sua eliminação do ambiente. Entretanto, estudos revelam que o seu potencial infectante pode ser reduzido pela exposição viral a altas temperaturas, ou mesmo inativado por desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), por agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e por amônio quaternário ou fenol (SHIBATA et al., 2003; PONTES et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito das condições ambientais e dos tratamentos térmicos e químicos sobre a infectividade do PCV2 (Adaptado de López-Soria e Segalés, 2013).

	Efeito sobre a infectividade do PCV2
pH	• Redução da infectividade do PCV2 num tampão ácido (ainda que continue a ser viável a pH <2). • Marcada redução na infectividade de PCV2 a pH 11-12.
Tratamentos térmicos	• Não se conseguiu a inativação completa do PCV2 após a pasteurização a 60 °C durante 24 h ou a 75 °C durante 30 min, nem com calor seco a 80 °C durante 72 h ou a 120 °C durante 30 min, nem com calor húmido a 75 °C durante 15 min. • O PCV2 foi inativado com calor húmido a 80 °C durante 15 min. • Estes resultados podem variar dependendo do meio e da carga viral, já que o PCV2 é mais lábil em meios líquidos e pode apresentar cargas virais mais elevadas em carne de porco.
Tratamentos químicos	• O PCV2 é resistente a desinfetantes dissolventes de lípidos à base de álcool, clorhexidina, iodo ou fenol. • É conseguida uma redução dos títulos de PCV2 com desinfetantes alcalinos, como a soda cáustica (hidróxido de sódio), agentes oxidantes, como a lixívia (hipoclorito sódico) e compostos de amónio quaternário.

2.4.3 Variação genética

A homologia genética entre os isolados de PCV2 é relativamente alta, embora exista diversidade entre as populações do mesmo. De fato, o PCV2 ganha diversidade genética mediante a acumulação de mutações pontuais e através da recombinação. Dados históricos mostram que o domínio do genótipo do PCV2 é inconstante. Por meio de análise filogenética com base na variação genética dos

genes da sua cápside, o PCV2 divide-se em dois grupos principais designados como genótipos de PCV2a e PCV2b (GRAU-ROMA et al., 2008; SEGALÉS et al., 2008).

Tem sido proposto que as diferenças nas sequências de aminoácidos implicam em diferenças na patogênese. Avaliações epidemiológicas de surtos e casos esporádicos sugerem que o PCV2a é potencialmente menos virulento, e que teria sido o genótipo mais frequente por muito tempo. O PCV2b evoluiu a partir do tipo 2a e é atualmente responsável pela maioria dos casos clínicos da síndrome multissistêmica. Enquanto isso especula-se que o genótipo PCV2a era responsável por infecções clinicamente inaparentes (DUPONT et al., 2008; GRAU-ROMA et al., 2008; GUO et al., 2010; JANTAFONG et al., 2011; PONTES et al., 2014).

Um estudo com amostras de suínos obtidas nos anos de 1980, 1987 e 1990, realizado na Dinamarca, revelou a existência de um terceiro genótipo, o PCV2c, que apresentou a menor patogenicidade dentre os genótipos conhecidos até o momento, sugerindo que houve um aumento gradativo da patogenicidade, desde os anos 80 até a atualidade (DUPONT et al., 2008).

No Brasil, estudos comprovam a presença dos dois genótipos do PCV2, confirmando, inclusive, que um mesmo animal pode ser infectado com ambos os genótipos (HESSE et al., 2008; CIACCI-ZANELLA et al., 2009; CHIARELLINETO et al., 2009).

A detecção de cepas distintas de PCV2 no mesmo suíno, seja pertencendo ao mesmo genótipo ou a genótipo diferente, tem sido relatada. Estudos demonstraram o potencial homólogo de recombinação entre cepas do PCV2 que estejam coinfectando o mesmo animal ou, simultaneamente, se replicando em cultivo celular (ZHAI et al., 2011; PARK et al., 2014; KNOW et al., 2017).

3.3 SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DE SUÍNOS (PMWS)

A Síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos (PMWS) é uma doença emergente que causa elevada mortalidade em suínos nas fases de creche e de

crescimento, acometendo suínos principalmente de seis a doze semanas de idade (BARBOSA e FREITAS, 2008; LIU et al., 2015).

Desde a sua descoberta e caracterização no oeste do Canadá, em 1991, a importância e disseminação da Síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos (PMWS) cresceu e a síndrome passou a ser considerada como uma das doenças de suínos mais importantes do mundo, ocorrendo em vários locais onde a suinocultura tem grande expressão econômica, representando assim um problema sério na indústria suína global (HARDING, 2004; HANSEN et al., 2010; JANTAFONG et al., 2011; LIU et al., 2015).

Nesse contexto, o PCV2 tem sido apontado como o principal agente etiológico da síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos. O caráter imunossupressor do vírus possibilita o estabelecimento de outras infecções que associadas a fatores estressantes como as altas densidades populacionais em ambientes restritos e a junção de animais de diferentes idades, podem favorecer o desencadeamento da PMWS (CORREA et al., 2006; BARBOSA et al., 2011).

3.3.1 Manifestações clínicas

A maioria dos sinais clínicos da PMWS são inespecíficos, mas seis sinais clínicos fundamentais formam a base do diagnóstico clínico preliminar: caquexia, dispnéia, linfadenopatia, diarreia, palidez e icterícia. Tosse, pirexia, úlcera gástrica, meningite e morte súbita, também, têm sido relatados, porém são menos frequentes (MADEC et al., 2000; HARDING, 2004; DEZEN, 2011).

As lesões histopatológicas são observadas em diversos órgãos, mas predominantemente nos tecidos linfoides do baço, tonsilas e linfonodos. Com um sistema imunitário deficiente, animais doentes são mais susceptíveis a infecções oportunistas (Quadro 1) (CIACCI-ZANELLA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008, KEKARAINEN et al., 2010).

Quadro 1- Manifestações clínicas da PMWS.

Manifestações típicas	Lesões histopatológicas
• Perda progressiva de peso • Comprometimento respiratório • Anemia • Aumento do volume dos linfonodos superficiais inguinais • Diarreia • Icterícia • Morte	• Depleção de linfócitos T e B • Proliferação de histiócitos • Formação de células gigantes multinucleadas • Ocasionalmente, presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos • Alteração no padrão de respostas de citocinas

Também se observam lesões com ocorrência e frequência variável como hepatites, nefrites e pneumonia intersticial nos animais infectados. Na PMWS, há predominância de lesões de pele e renais (CIACCI-ZANELLA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

Animais afetados pela PMWS apresentam também desidratação e distúrbios do sistema nervoso caracterizados por tremores, desordens locomotoras, prostração, convulsões e depressão (PONTES et al., 2014).

3.4 TRANSMISSÃO

A transmissão horizontal do vírus pode ocorrer pelo contato com suínos infectados, instalações, equipamentos e fômites. 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 (GAVA et al., 2008; PONTES et al., 2014).

A detecção de PCV2 pode ser observada em todas as vias de excreção do hospedeiro, nomeadamente nas vias nasais, broncotraqueal, orofaríngea, oculares, saliva, fezes e urina de animais com e sem sinais clínicos da PMWS. No entanto, quando o animal apresenta sinais clínicos, a excreção do vírus é mais intensa (GHEBREMARIAM e GRUYS, 2005; CASTRO et al., 2007; BAEKBO et al., 2012).

Embora não se conheçam bem os mecanismos nem a frequência com que ocorre a transmissão vertical, a associação do PCV2 com abortos e natimortos, como demonstrado por lesões nos tecidos fetais, indica que a transmissão transplacentária também pode ser um fator importante se matrizes soros-negativa forem infectadas durante a prenhez. Entretanto, a transmissão transplacentária é considerada relativamente rara, atribuindo-se a maioria das infeções por PCV2 ao pós-parto (LÓPEZ-SORIA et al., 2008; BORTOLETTO et al., 2014; FERNANDES, 2017).

Alguns estudos demonstraram que o PCV2 pode ser transmitido pelo sêmen para matrizes e respectivos fetos durante a gestação. Em estudo realizado com marrãs provenientes de granjas livres de patógenos (SPF), estas foram inseminadas com sêmen contendo elevada concentração de PCV2. Elas apresentaram falhas reprodutivas e foi isolado PCV2 nos leitões abortados (GAVA et al., 2008; MADSON et al., 2009). No entanto, não se sabe se a quantidade natural de PCV2 contida no sêmen é suficiente para infectar as porcas e os leitões. Alguns autores afirmam que esta via de transmissão, pode não ser suficiente para desencadear patologias que provoquem morte embrionária ou fetal e infeções uterinas nas porcas. López-Soria et al. (2011) observaram que matrizes inseminadas com sêmen infectado pelo vírus, bem como seus fetos, não manifestaram viremia e nem foram detectados anticorpos para PCV2.

De acordo com estudos, o período de transmissão ocorre entre a 5^a e a 16^a semanas, com fase crítica e mortes ocorrendo por volta da 13^a semana. Quanto aos 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 (MADEC et al., 2000; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003).

3.5 DIAGNÓSTICO DAS SÍNDROMES ENVOLVIDAS COM AS CIRCOVIROSES SUÍNAS

O diagnóstico das síndromes causadas pelo *Circovírus* tipo 2 deve ser realizado pela associação dos sinais clínicos compatíveis com a doença, achados de lesões histopatológicas e da detecção do antígeno ou ácido nucléico de PCV2 nas lesões. Estes três critérios não podem ser utilizados separadamente, pois a presença do PCV2 não implica necessariamente em doença, assim como alguns sinais clínicos não são específicos das síndromes associadas ao *círcovírus* (CORREA et al., 2006; NASCIMENTO, 2009; AFOLABI et al., 2017).

Um diagnóstico de infecção subclínica por PCV2 é estabelecido quando, embora detectado no soro ou nos tecidos, a quantidade viral é pequena e associada a um número mínimo ou à ausência de lesões (OLIVER-FERRANDO et al., 2016; AFOLABI et al., 2017).

A literatura cita diversas maneiras para a detecção da presença de PCV2, entre elas, isolamento viral, imuno-histoquímica, hibridização *in situ*, PCR, PCR em tempo real e nested PCR (NPCR) (ALLAN e ELLIS, 2000; QUINTANA, et al., 2001; KIM e CHAE, 2003; CIACCI-ZANELLA et al., 2006; VILCEK et al., 2010; ZHENG, et al., 2013).

3.5.1 Imuno-histoquímica e Hibridização *in situ*

A imuno-histoquímica (IHQ) é o método de identificação de antígenos nos tecidos, utilizando o princípio da ligação específica de anticorpos e antígenos. Nesta técnica, para detectar antígeno de PCV2, utiliza-se um anticorpo monoclonal ou policlonal em secções de tecido fixadas com formol e embebidas em parafina. Barbosa e Freitas (2008) utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para demonstração de anticorpos contra o 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. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade, e apresenta custo baixo a moderado.

A Hibridização *in situ* (HIS) é uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos. A Hibridização *in situ* para PCV2 utiliza uma sonda de DNA marcada que corresponde a uma parte do genoma do PCV2.

Entre as duas técnicas a HIS demonstra ser mais específica quando comparada com a IHQ, porém é uma técnica mais laboriosa, requer treinamento específico e tem custo considerável (OPRIESSNIG et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

3.5.2 PCR convencional e PCR em tempo real

A Reação em cadeia da polimerase ou PCR, permite a amplificação de qualquer sequência de DNA coletada de amostras de materiais biológicos, tornando possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a sequência que é alvo do estudo. Através da PCR se pode diferenciar PCV1, PCV2 e PCV3, sendo considerada uma técnica muito sensível. Além disso, uma PCR quantitativa 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., 2005).

A reação de amplificação de DNA por PCR envolve o emprego dos quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências de iniciadores específicos (primers), uma DNA polimerase termoestável, o DNA molde - previamente extraído da amostra clínica suspeita, cloreto de magnésio (MgCl₂) - um cofator para atividade da Taq DNA polimerase, um tampão - geralmente cloreto de potássio (KCl), para manter o pH e a condição adequada para atividade enzimática e água ultrapura, como diluente. O princípio da PCR envolve três etapas básicas de variação de temperatura por ciclo: Desnaturação da fita molde de DNA (etapa

com duração entre 30 s a 1 min a temperatura entre 92°C a 96 °C); Pareamento de dois iniciadores sintéticos de composições distintas, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, ligando-se à região complementar da fita de DNA alvo que sofrerá a duplicação (etapa com duração de 30 s a 1 min a temperatura entre 58 °C e 65 °C); Amplificação por meio da enzima Taq DNA polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando os quatro dNTP's como substrato da reação de polimerização (etapa com duração entre 45 s e 1 min a 72 °C) (HAAS e TORRES, 2016).

A PCR em tempo real compreende uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção do resultado é feita ao longo dos ciclos através de marcadores. O risco de contaminação se torna menor. Recentemente, esta técnica foi otimizada e vem sendo utilizada na detecção do PCV2 (VILCEK et al., 2010; ZHENG et al., 2013).

3.5.3 Nested PCR

A nested PCR (NPCR) é uma variação da PCR convencional, muito utilizada em algumas situações, onde a PCR convencional não é suficiente para a detecção de uma determinada sequência de DNA.

Na NPCR são utilizados 2 pares de primers para amplificar um mesmo fragmento. Para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo as sequências localizadas fora dela, e utilizando-se este primeiro produto, segue-se à amplificação da real sequência-alvo. Nesse segundo momento, apenas uma pequena quantidade da amostra original é passada para o segundo round de amplificação, diluindo assim possíveis PCR inibidores, aumentando simultaneamente a especificidade e sensibilidade do amplicon alvo (Figura 4) (CIACCI-ZANELLA et al., 2006; PAXSON, 2008).

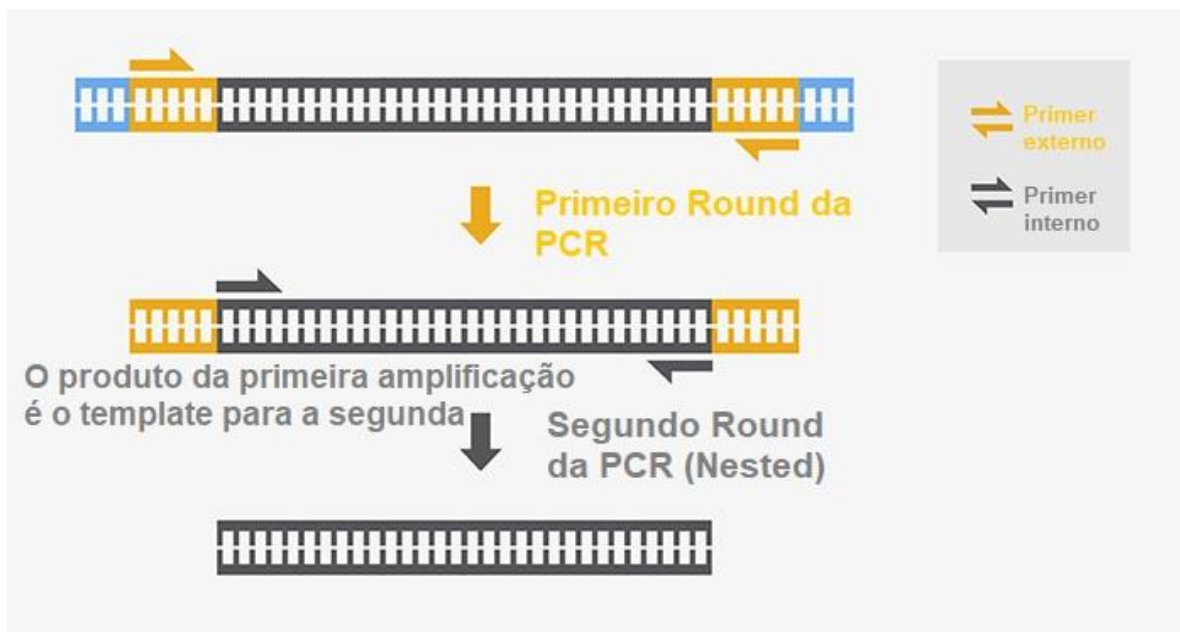


Figura 4 - Esquema de uma reação de Nested PCR.

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 e Chae (2003) utilizaram a multiplex Nested PCR para diferenciar PCV1, PCV2 e parvovírus suíno (PPV) em tecidos incluídos em parafina e compararam essa técnica com a técnica de hibridização *in situ* e obtiveram 100% de positividade para os agentes virais. Ciacci-Zanella et al. (2006) identificaram o *Circovírus* suíno 2 por NPCR e imuno-histoquímica.

Apesar do aumento na sensibilidade de detecção, quando comparada a PCR convencional, a grande desvantagem da Nested PCR é o aumento das chances de contaminação, uma vez que existe a necessidade de abertura do tubo após a primeira etapa da reação para proceder com a segunda etapa (transferência de amplicons), o que favorece o aparecimento de resultados falso positivos e reduz a confiabilidade do método.

3.5.4 STNPCR

A Nested PCR em tubo único (STNPCR) é uma variação da Nested PCR convencional, onde as duas etapas da reação ocorrem em um único tubo, sem que seja necessária a abertura do mesmo (Figura 5).

É possível encontrar na literatura o desenvolvimento e a aplicação com êxito da STNPCR para diagnóstico de patógenos humanos e animais, sendo esta uma técnica com maior sensibilidade de detecção, se comparada com a PCR convencional (SOUZA et al. 2007).

A junção de duas reações de amplificação em um único tubo, além de reduzir consideravelmente o risco de contaminação, oferece uma diminuição nos gastos com reagentes, favorecendo a implementação do uso dessa variação da PCR na rotina do diagnóstico do PCV2 (LIMA,2009; SILVA, 2012).

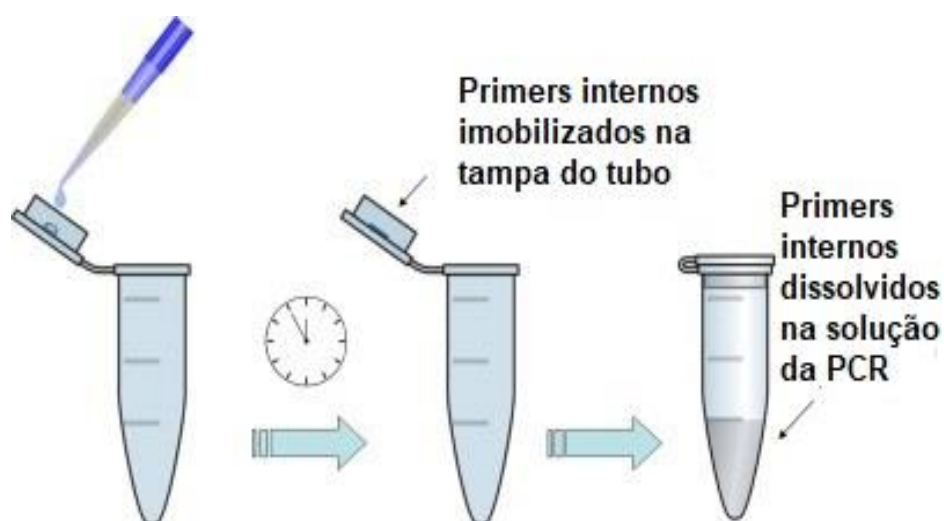


Figura 5 - Representação da técnica de Nested PCR em tubo único (Adaptado de Silva et al., 2013).

3.6 VACINAS COMERCIAIS

O uso de vacinas é uma forma barata de evitar ou minimizar perdas devido a doenças infecciosas, sejam elas, enfermidades epizooticas ou doenças da

produção. A vacinação contra o PCV2 é realizada na maioria dos produtores de suínos, com imunização das fêmeas e leitões (AMARAL et al., 2006; ASSAYAG JR, et al., 2017).

A eficácia das vacinas comerciais atualmente disponíveis para PCV2 (Quadro 1), foi amplamente demonstrada, uma vez que, os efeitos importantes na redução do impacto da doença, na melhoria dos parâmetros de produção, na diminuição das coinfeções, aumento no ganho de peso diário e na redução da viremia e taxas de mortalidade e sacrifício, foram observados nos suínos imunizados (Figura 6) (OLIVER-FERRANDO et al., 2016; AFOLABI et al., 2017). Ensaio em laboratório e em condições de campo demonstraram que a vacinação de leitões contra o PCV2 reduz o impacto de PMWS, ao provocar uma resposta imunitária tanto humoral (anticorpos totais e neutralizantes) como celular (mediada pelas células produtoras de IFN- γ) e reduzindo e/ou atrasando a infecção por PCV2 (KRISTENSEN, 2011).

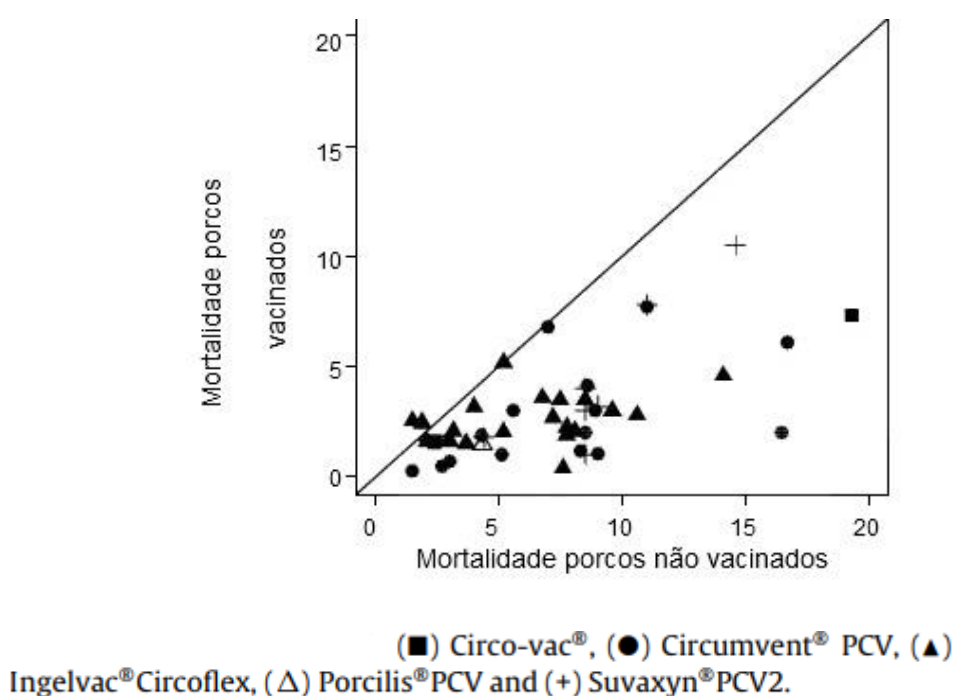


Figura 6 - Mortalidade de porcos vacinados e não vacinados de acordo com meta-análise sobre o efeito da vacinação contra PCV2 (Kristensen et al, 2011).

No entanto, apesar do sucesso registrado das vacinas para PCV2, foi demonstrado que o período de proteção das mesmas contra doenças é limitado e o vírus não pode ser erradicado por um procedimento de vacinação. Assim, as vacinas atualmente disponíveis aplicadas mais especialmente como um

protocolo de dose única não dão imunidade esterilizante em rebanhos de suínos (Quadro 2) (FENG et al. 2014).

Quadro 2 - Vacinas comerciais contra PCV2 (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

A primeira vacina comercial disponível no mercado contra PCV2 foi a CIRCOVAC®, do laboratório Merial, disponível no Canadá, Europa e Brasil, é baseada na abordagem clássica de vírus íntegro inativado e adjuvante, para uso em animais adultos (marrãs e porcas) de duas a quatro semanas antes da parição, sendo recomendada aplicação de duas doses antes do acasalamento ou inseminação artificial e de uma dose após cada parto (JOISEL et al., 2007; GARCIA, 2008; GRAU-ROMA et al., 2011).

Em contrapartida, estão disponíveis três vacinas comerciais para uso em leitões ao redor de 3-4 semanas de idade ou leitões mais velhos. Duas delas correspondem a vacinas geneticamente modificadas de PCV2 com base na expressão da proteína Cap no sistema de expressão em Baculovírus, a Ingelvac CircoFLEX®, disponível nos Estados Unidos, e a Porcilis PCV® Circumvent®, não disponível no Brasil (GARCIA, 2008; FACHINGER et al., 2008; FORT et al., 2008; KEKARAINEN et al., 2010).

A quarta vacina disponível no mercado, Suvaxyn PCV2 OneDose®, disponível nos Estados Unidos, aprovada pela Comissão Técnica Nacional (CTNBIO), uma

vez que se trata de um produto geneticamente modificado, é baseada em um vírus quimérico contendo a estrutura genômica central não patogênica do PCV1, do circovírus suíno 1, mas substituindo seu gene ORF2 pelo ORF2 de PCV2. (FENAUX et al., 2004; KEKARAINEN et al., 2010).

Uma nova variante PCV2b foi encontrada nos Estados Unidos, associada a circovirose 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).

Além das vacinas comerciais atualmente disponíveis, outros protótipos de vacinas têm sido delineados e testados em diversos modelos in vivo. Estes incluem vacinas inativadas, vacinas produzidas a partir de DNA e vacinas de subunidade recombinantes com expressão de proteínas virais do PCV2. Entretanto, a imunogenicidade desses produtos foi testada na maioria das vezes em ratos e, portanto, a capacidade de proteção da vacina não foi devidamente avaliada. (LIU et al., 2000; SONG et al., 2007; FANE et al., 2008; WANG et al., 2008).

3.7 PREVENÇÃO

Como uma doença multifatorial que tem sido associada a fatores infecciosos e não infecciosos, o controle efetivo da PCVD pode ser alcançado não somente pelas aplicações de vacinas, mas também pelo controle dos fatores de risco envolvidos no progresso da doença (AFOLABI et al., 2017).

É fundamental a existência de planos profiláticos que devem ser implementados a diferentes níveis, atuando no manejo adequado dos suínos, biossegurança e vacinação, o que permitirá aos produtores gerirem grande parte dos problemas originados pelo PCV2 (FERNANDES, 2017).

Um plano de recomendações contendo 20 pontos importantes foi proposto por Madec et al. (2000), no sentido de ajudar os produtores a identificar e ajustar práticas de manejo que favoreciam o aparecimento das circovirose. Os pontos principais do plano de Madec incluem a limitação do contato entre suínos de leitegadas distintas, redução do estresse, otimização das condições de higiene

e boa nutrição. A implementação do referido plano reduziu significativamente as perdas associadas ao PCV2, sendo o mesmo ainda hoje considerado um modelo de estratégias de intervenção para o controle da referida doença (MADEC et al., 2000; FORT, 2010).

3.8 FLUIDO ORAL PARA O DIAGNÓSTICO

O fluido oral (FO) é uma mistura de saliva, produzida pelas glândulas salivares maiores e menores, e transudato das mucosas gengival e bucal, contendo anticorpos derivados do soro sanguíneo (PRICKETT et al., 2008).

A literatura reporta a aplicação com sucesso do FO no diagnóstico laboratorial de diversos patógenos de grande importância para a saúde humana e animal, atuando na investigação de anticorpos e de antígenos ou ácidos nucleicos (PRICKETT E ZIMMERMAN, 2010; KITTAWORNARAT et al., 2012; BARBOSA et al., 2013; GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2013; SHAEFER et al., 2013).

Nesse contexto, destacam-se os animais de produção, principalmente a espécie suína que tem ampliado as perspectivas no desenvolvimento de métodos laboratoriais, aplicação nos diagnósticos laboratoriais e monitoramento das infecções nos rebanhos (BARBOSA JÚNIOR, 2015).

Nos suínos, a colheita do FO ocorre por meio de dispositivos que estimulam a mastigação, como é o exemplo das cordas de algodão. Esse método de coleta do fluido oral em suínos é recomendado em decorrência de sua simplicidade, segurança e de promover o bem-estar do animal, uma vez que trata-se de um método de natureza não invasiva, de fácil execução e baixo custo, apresentando ainda um baixo risco ocupacional para os profissionais de saúde durante sua coleta e processamento. Além disso, o método garante a obtenção de amostras em quantidade e qualidade nas diferentes faixas etárias do ciclo de produção (OLSEN et al., 2012; WHITE et al., 2012; BARBOSA et al., 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

O método das cordas de algodão foi o escolhido para a coleta do material biológico dos suínos.

Para isto, cordas de algodão com cerca de 5cm de diâmetro, que devido a seu potencial absorvivo de líquidos, retém o fluido oral, foram posicionadas pelo operador próximo ao dorso dos animais.

O processo de coleta do fluido oral é simples e muito prático, uma vez que leva em conta o comportamento natural curioso dos suínos, os quais interagem e brincam com a corda de algodão, depositando o fluido oral na mesma (SCHAEFER et al., 2013).

Após o período de mastigação de 5 a 10 minutos, a recuperação da amostra foi feita da seguinte forma: as cordas umedecidas pelo fluido oral foram colocadas individualmente em sacos plásticos, sendo o líquido extraído por compressão da extremidade úmida da corda dentro do próprio saco plástico. A parte inferior do canto do saco plástico foi cortada e o fluido drenado para um tubo de ensaio. Com a aplicação do método, é possível se recuperar um volume igual ou superior a 3mL de amostra (BARBOSA et al., 2013)

Sendo assim, foram coletadas 55 amostras de suínos clinicamente saudáveis. Após a coleta, as amostras serão devidamente identificadas, acondicionadas em gelo e transportadas ao laboratório.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA total das amostras de fluido oral foi extraído pelo kit comercial Wizard® (Genomic DNA Purification - Promega, EUA) seguindo as condições indicadas pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha). A qualidade do DNA foi verificada através de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o gene Beta-actina suína.

4.3 PRIMERS

Para a PCR direcionada ao gene da β -actina suína foi desenhado o par de *primers* F-Beta-ActinaSuina: 5' - CAC GCC ATC CTG CGT GA - 3' R-Beta-ActinaSuina: 5' - AGC ACC GTG TTG GCG TAG AG - 3', que amplificou um produto de 478 pb.

A reação “outer-PCR” (externa) foi realizada com um par de *primers* externos F1: 5' - CGGATATTGTAGTCCTGGTCG -3' R1: 5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA -3', 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' e R2: 5' - ATTGACGACTTTGTTCCCCC -3', que amplificou um produto final de 225 pb contido no fragmento anteriormente amplificado (Kim et al., 2001).

4.4 PCR PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA

Para garantir a segurança e confiabilidade dos resultados obtidos, descartando a eventual presença de inibidores da PCR e assegurar a adequada extração de DNA, uma PCR qualitativa direcionada para o gene da β -actina foi realizada em todas as amostras, com o objetivo de excluir os falsos negativos.

Testes para otimizar os parâmetros de temperatura de anelamento e concentração dos *primers* para o gene da β -actina suína foram realizados, sendo testadas as temperaturas de 52, 54, 57, 58 e 59°C e concentração de *primers* de 0,04 μ M e 0,24 μ M.

As reações foram otimizadas por concentrações de 0,025 u/ μ L da Taq DNA Polymerase, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), 0,24 μ M de *primers* e 4 μ L dos controles e das amostras clínicas.

A amplificação consistiu de 30 ciclos (95°C por 2 min, 94°C por 15 seg, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 1 min).

4.5 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO

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.

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 transformada em *E.coli* (DH5 alfa). Após a extração plasmidial a clonagem foi confirmada por sequenciamento (PONTES et al., 2014).

As amostras negativas de referência foram obtidas a partir do fluido oral de animais livres de patógenos específicos (SPF). Também foi utilizado o controle negativo de reação (branco) que consiste em uma solução contendo apenas mix e água, com ausência de amostra de DNA.

4.6 NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)

A técnica de STNPCR foi realizada conforme protocolo descrito por Souza et al. (2007). Quanto aos parâmetros, os números de ciclos e a concentração dos *primers*, estes também foram descritos por Souza et al. (2007) com alterações, uma vez que essa técnica foi aplicada em tecidos, e o presente trabalho objetivou padronizá-la para o fluido oral.

Em ambas as reações, externa e interna, foram testadas temperaturas de anelamento de 60, 62 e 63 °C. O tempo de extensão da segunda etapa (interna), também foi padronizado, sendo testado o tempo de 1, 3, 5 e 10 minutos. Avaliou-se também a concentração de *primers* externos de 0,04 µM e 0,24 µM.

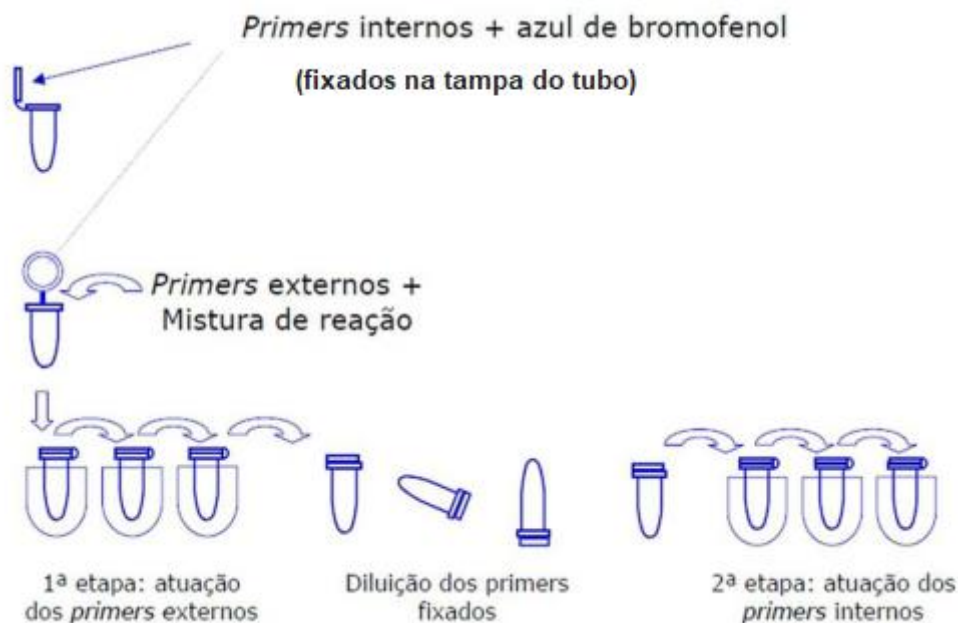


Figura 7 - Esquema representativo da nested-PCR em tubo único (STNPCR) (Adaptado de Souza et al., 2007).

Resumidamente, as reações foram otimizadas por concentrações de 0,025 u/μL da Taq DNA Polymerase, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), 0,04 mM de *primers* externos e 0,4 μM de *primers* internos (1 pmol: 10 pmol) e 2 μL dos controles e das amostras clínicas.

Na preparação da reação, 0,4 μM dos *primers* internos com marcações do corante azul de bromofenol foram previamente imobilizados no interior da tampa do tubo de *ependorf* 200 μL 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, 95°C por 1 min, 62°C por 1 min e 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 foi

realizada em 45 ciclos (95°C por 2 min, 95°C por 1 min, 63°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 3 min.).

4.7 TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade de detecção das metodologias foi avaliada através de diluições em série de DNA do controle positivo de referência (ORF2 do PCV diluída em amostra sabidamente negativa de F.O.). A concentração de DNA foi medida com espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). Foi testada a gama de diluições 2.8×10^8 a $2,8 \times 10^2$ cópias de DNA.

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, utilizando amostras de animais livres de germes patogênicos específicos (Specific Pathogen Free - SPF).

4.8 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. Para realização de eletroforese para DNA foram utilizados géis de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Foi adicionado ao gel solução de brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 µg/ml, para promover visualização das bandas de DNA através de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (Loading Dye 6X), tendo como referencial o marcador de 100pb e 1Kb (GeneRuler DNA Ladder - Ludwig Biotec) molecular disposto no gel juntamente com as amostras e com os controles positivo e negativo da reação, em seguida o gel foi foto documentado.

5 RESULTADOS

5.1 PCR PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA

A qualidade do DNA extraído foi verificada através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene da Beta-actina suína. De acordo com os resultados dos testes de otimização, optou-se por usar as concentrações dos primers de 0,24 μ M, enquanto que a temperatura de anelamento foi padronizada em 58°C, e o número de ciclos foi 30.

O desenvolvimento desta técnica resultou na amplificação do produto esperado, com 478 pb (Figura 8). A técnica foi aplicada nas 55 amostras, sendo positiva em 100%, o que assegura a viabilidade do DNA contido nas mesmas.

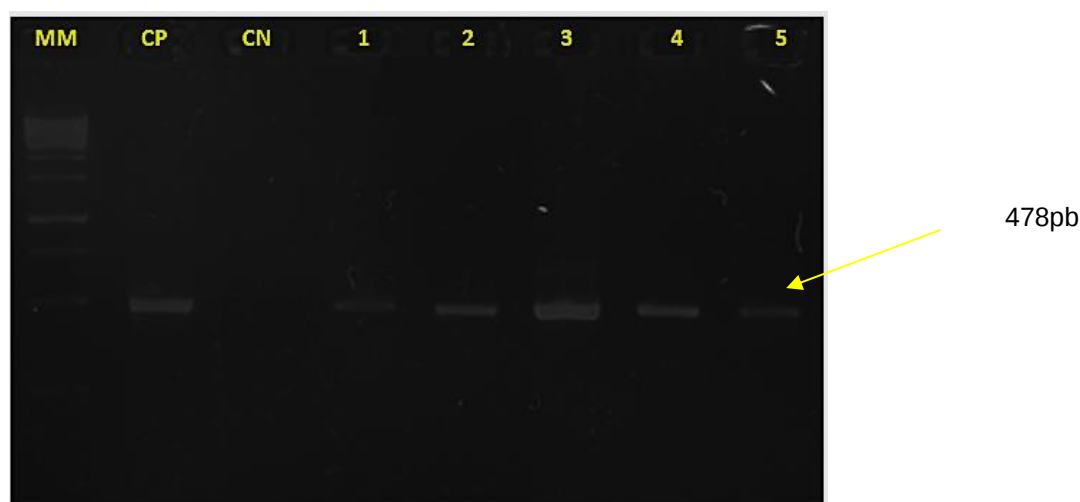


Figura 8 - Gel representativo da PCR direcionada ao gene da β -actina suína. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); Canaletas 1-5: amostras de FO de suínos; CP: controle positivo de referência; CN: controle negativo de reação (água).

5.2 NESTED PCR EM TUBO ÚNICO (STNPCR)

No primeiro experimento do processo de padronização da técnica de STNPCR, os parâmetros de tempo e temperatura, número de ciclos, concentração de primers e de amostras, foram baseados na técnica de Pontes e colaboradores (2014).

A primeira etapa de amplificação consistiu de 15 ciclos (95°C por 3 min, 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e 95°C por 2 min). A segunda etapa de amplificação foi realizada em 45 ciclos (95°C por 1 min, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 10 min).

Como já esperado, uma vez que o estudo supracitado utilizou tecidos como amostra, a técnica apresentou bandas inespecíficas e dímeros de primers e precisou ser otimizada (Figura 9).

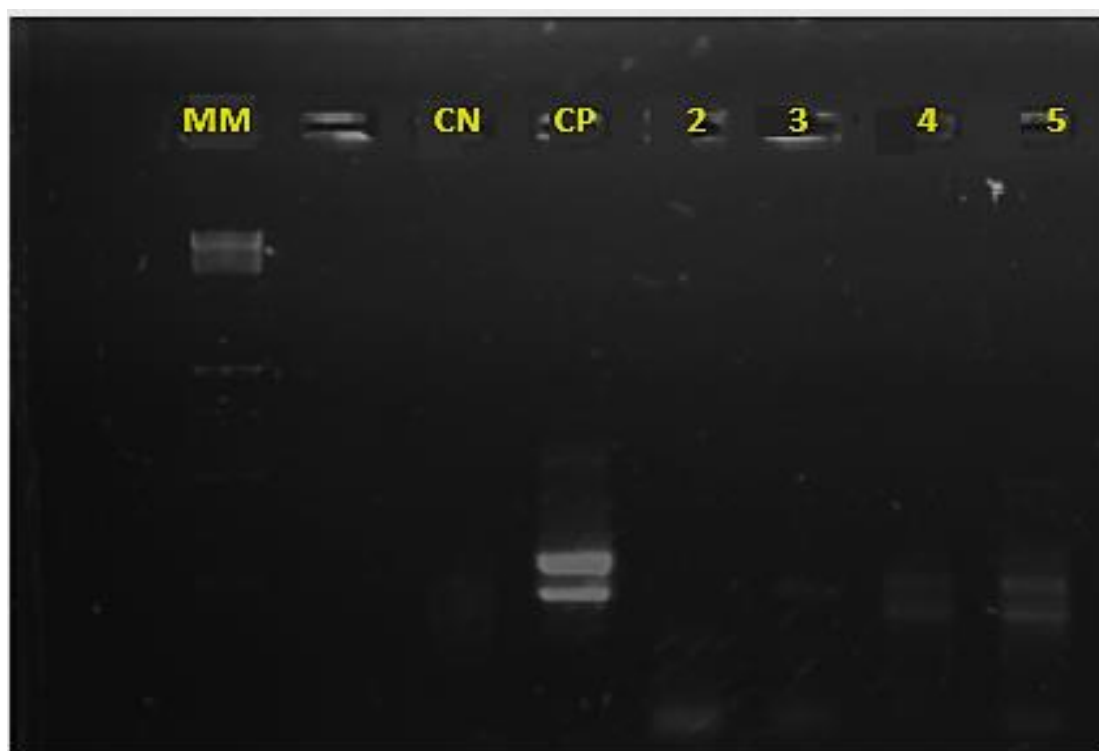


Figura 9 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas - SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 2-5: amostras de FO de suínos.

No segundo experimento, a temperatura de anelamento da segunda etapa foi aumentada de 62°C para 63°C, porém ainda observou-se a presença de bandas inespecíficas e dímeros de primer, o que evidencia a necessidade de mais alterações (Figura 10).

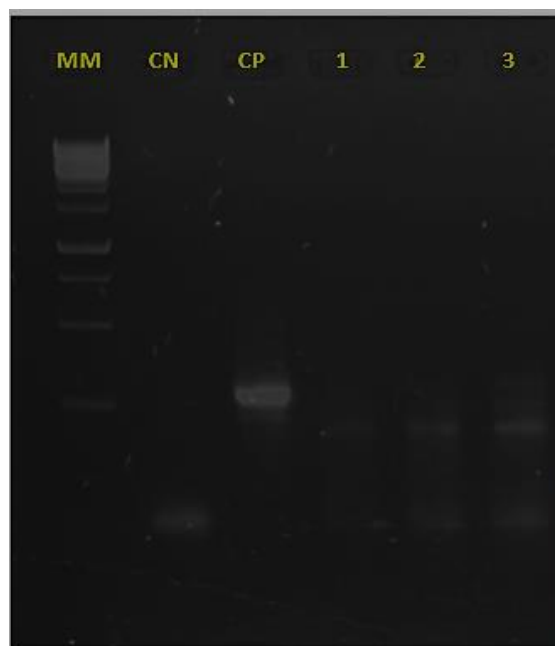


Figura 10 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas - SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); CN: Canaletas 1-3: amostras de FO de suínos.

No terceiro experimento, na tentativa de eliminar as bandas inespecíficas, o tempo de extensão final foi reduzido para 3 minutos, e quando comparado ao de 10 minutos, conseguiu retirar as bandas inespecíficas (Figura 11).

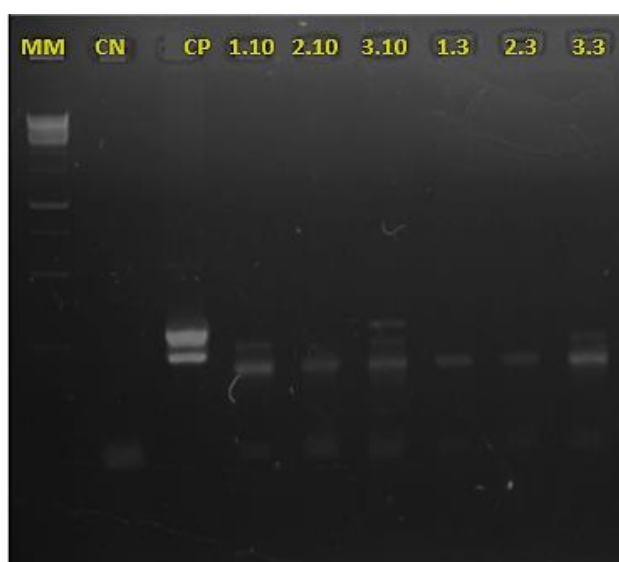


Figura 11 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas -SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1.10-3.10: amostras de FO de suínos/ 10 min no tempo de extensão; Canaletas 1.3-3.3: amostras de FO de suínos/ 3 min no tempo de extensão.

Seguindo o mesmo princípio do experimento anterior, no quarto experimento tempo de extensão final foi novamente reduzido para 1 minuto. Porém o mesmo gerou bandas mais fracas. O tempo de extensão final selecionado foi o de 3 minutos (Figura 12).

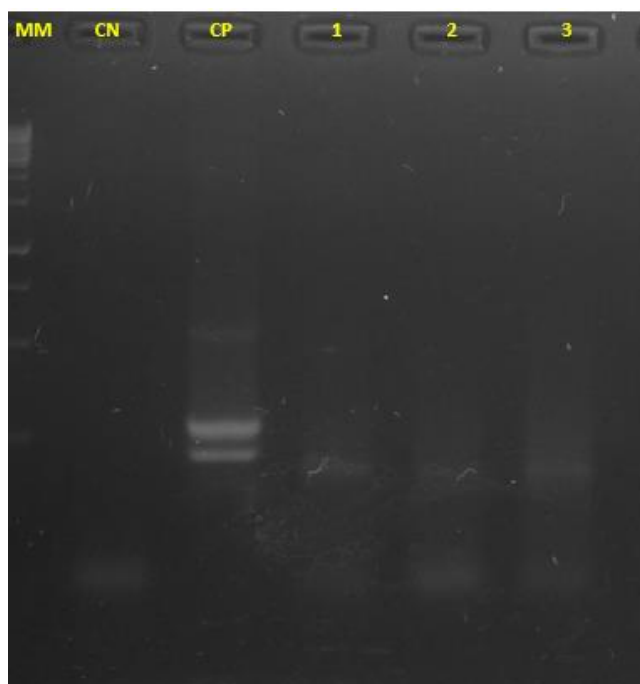


Figura 12 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas - SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1-3: amostras de FO de suínos.

No quinto experimento, a alteração foi feita nos primers externos, com a substituição de uma concentração de 0,04 mM para 0,24 mM. Essa alteração gerou bandas mais fracas (Figura 13).

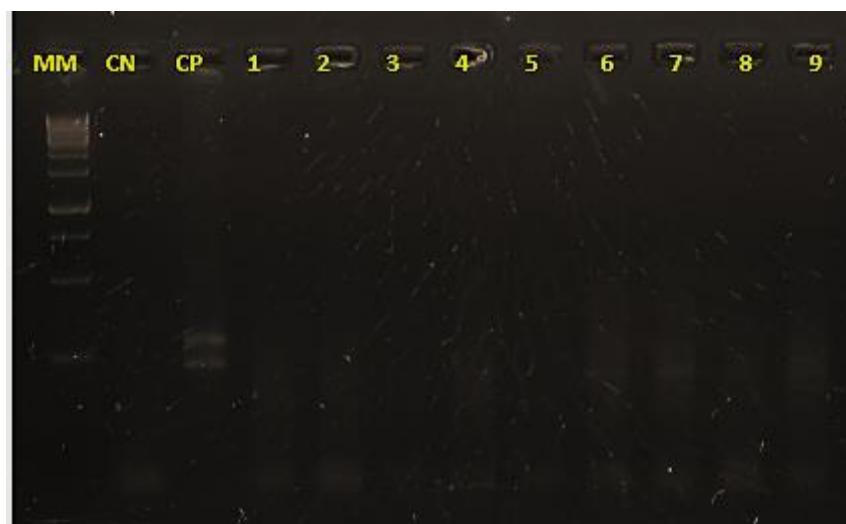


Figura 13 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas - SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaletas 1-9: amostras de FO de suínos.

No quinto experimento, a alteração foi feita no tempo do 3º step e no tempo de extensão, que foram reduzidos para 45 segundos e 1 minuto, respectivamente. Essa alteração gerou bandas menos visíveis (Figura 14).

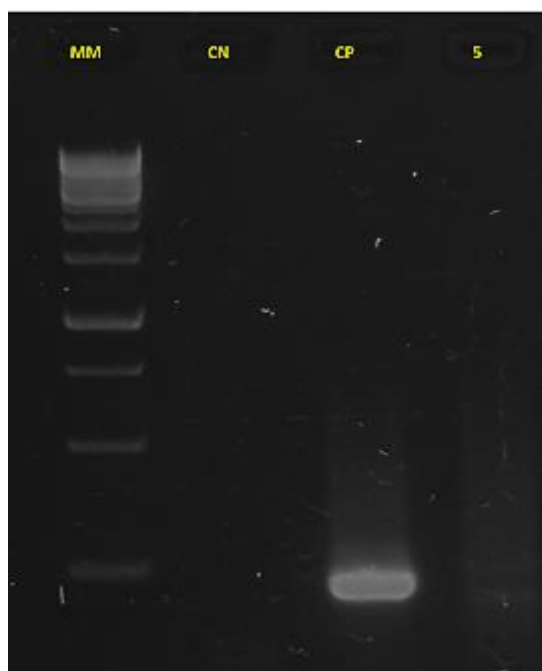


Figura 14 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas- SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); Canaleta 5: amostras de FO de suínos.

Após a série de experimentos, optou-se por usar a concentração de primers externos e internos de 0,04 μM e 0,4 μM , respectivamente. As temperaturas de anelamento foram padronizadas para as duas etapas sendo 62°C e 63°C, respectivamente. Quanto ao número de ciclos foram realizados 15 ciclos no 1º estágio e 45 ciclos no 2ª estágio.

O desenvolvimento da técnica resultou em amplificação do produto esperado de 225 pb relativo ao PCV2 (Figura 15).

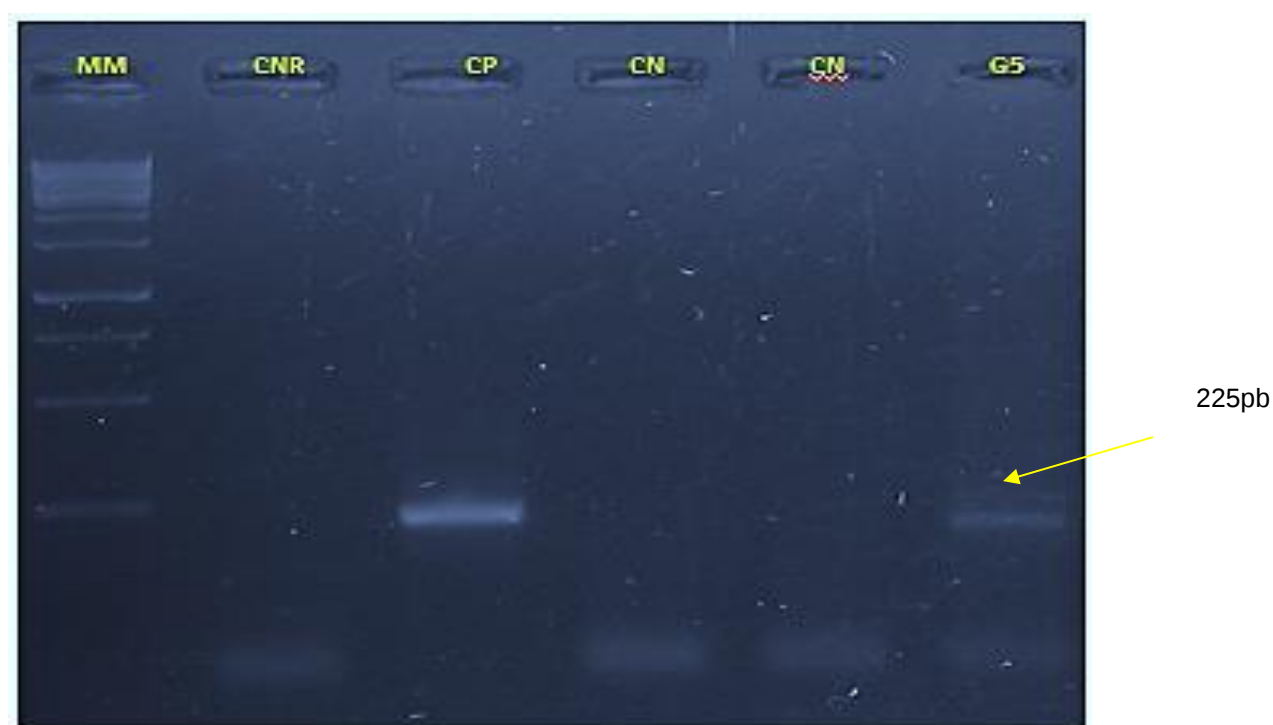


Figura 15 - Gel representativo da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); CN: controle negativo de referência (amostras sabidamente negativas - SPF); CP: controle positivo de referência (ORF do PCV); CNR: controle negativo de reação (água); G5: amostra de FO de suíno.

5.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A técnica de STNPCR teve sensibilidade de $2,8 \times 10^4$ cópias de DNA (Figura 16).

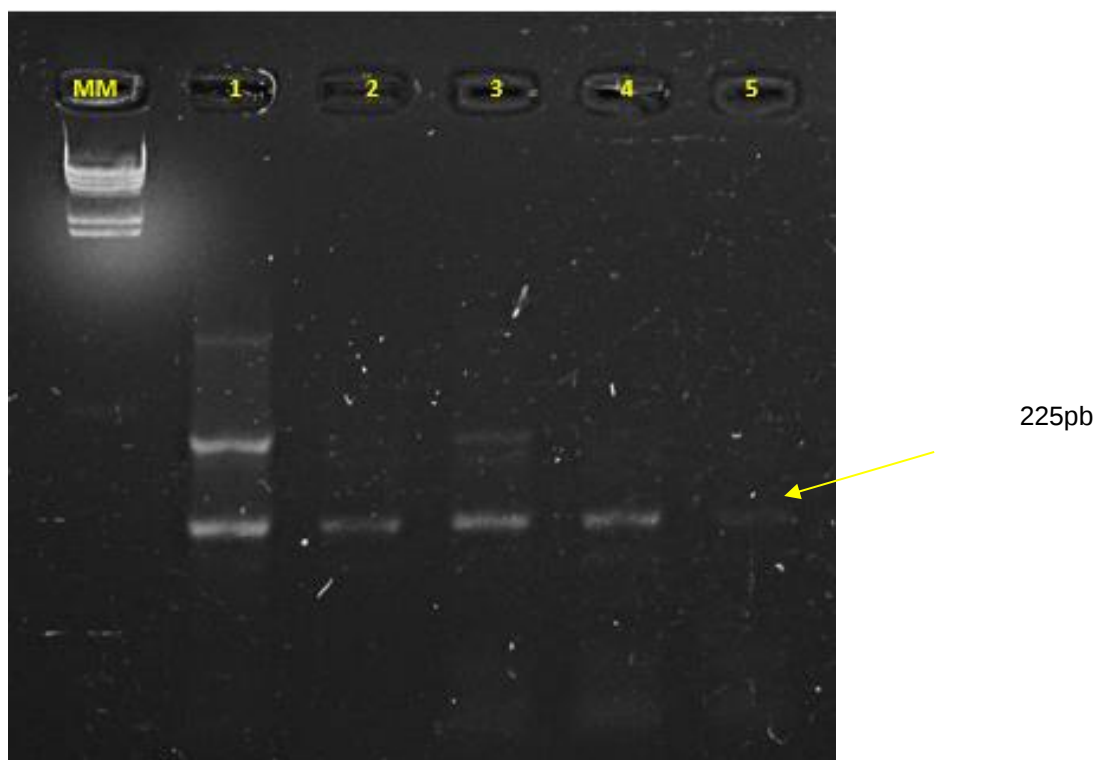


Figura 16 - Gel representativo do limite de detecção da STNPCR. MM: 1kb DNA ladder (Ludwig Biotec); Canaletas 1-5: Gama de diluição do controle positivo de referência (ORF do PCV) 2.8×10^8 a 2.8×10^4 cópias de DNA.

Os ensaios permitiram a verificação dos resultados positivos e negativos, bem como a ausência de reações inespecíficas.

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

6 DISCUSSÃO

Dentre as diferentes cadeias produtivas integrantes do sistema agroindustrial brasileiro, a suinocultura vem se destacando pelo forte dinamismo, apresentando grande articulação entre os diferentes agentes que a compõem, bem como pelo volume de investimentos injetados na atividade (RODRIGUES et al., 2009. GASTARDELO e MELZ, 2014).

Por outro lado, o crescimento desta atividade também culminou com o aumento da prevalência de microrganismos e doenças entre os rebanhos, e, de acordo com Rodrigues e colaboradores (2009), dada a crescente preocupação com a questão sanitária e a imposição de barreiras comerciais às exportações de carne suína, tem se observado a intensificação de medidas que visam melhorar o perfil sanitário desses animais, visando atender as exigências do mercado externo e interno. Esses fatores reforçam a necessidade da adoção de programas de fiscalização sanitária mais eficientes, desde a produção e abate até o transporte e comercialização; vacinação adequada e viabilização de técnicas laboratoriais mais eficazes para a detecção de patógenos.

Nesse contexto, o interesse no estudo de patógenos, tais como o PCV2, e de técnicas que possam diagnosticá-lo, é explicado pela sua dispersão e pelo impacto econômico que o mesmo representa no cenário da suinocultura mundial, culminando em enormes prejuízos econômicos para os produtores.

A circovirose afeta o sistema imunológico dos suínos, tornando-os mais suscetíveis às infecções causadas por microrganismos oportunistas, o que acaba por intensificar as despesas com o tratamento de tais infecções secundárias e potencializa os sinais clínicos e lesões nos animais (FRANÇA et al., 2005; TESTI et al., 2014; ASSAYAG JR, et al. 2017; BARCELLOS et al., 2017; TAKEUTI et al., 2017).

Barbosa e colaboradores (2008), verificaram que a infecção pelo PCV2 pode estar disseminada em suínos criados intensivamente sem a ocorrência dos sinais clínicos da PMWS, o que reforça a importância de detectar o vírus mesmo em animais clinicamente saudáveis, uma vez que estes podem estar contaminados pelo vírus e que a doença apresenta um amplo potencial de

disseminação, tanto em animais com sinais clínicos, como entre aqueles que não apresentam sinais e sintomas.

No contexto do diagnóstico do vírus, o tipo de amostra escolhido nesse estudo para as análises foi o fluido oral (FO). Trata-se de uma mistura de saliva e transudato mucoso oral que tem sido utilizado na medicina veterinária para detecção de anticorpos e agentes infecciosos (PRICKETT et al., 2008).

Estudos anteriores evidenciaram que o fluido oral suíno é rico em anticorpos e possível substituto do sangue em testes laboratoriais, uma vez que o método tradicional de coleta de sangue, além de exigir um investimento no treinamento específico dos técnicos e em equipamentos especiais, gera prejuízos na própria coleta e qualidade das amostras obtidas devido ao estresse provocado aos animais submetidos a essa prática (BARBOSA, 2005; PRICKETT et al., 2008; BARBOSA et al., 2013; NIELSEN et al., 2018).

Amostras de FO já foram investigadas para a reatividade de anticorpos e identificação de patógenos como Vírus da síndrome respiratória reprodutiva suína (KITTAWORNRAT et al., 2012), Circovirose suína (PRICKETT et al., 2008), Vírus da Influenza suína, (SCHAEFER et al., 2013), Pleuropneumonia suína (COSTA et al., 2012) e Erisipela suína (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2013).

O processo de coleta desse tipo de amostra é simples e muito prático, uma vez que leva em conta o comportamento natural curioso dos suínos, os quais interagem e brincam com a corda de algodão utilizada na colheita e com isso depositam o fluido oral na mesma. O método permite a obtenção de amostras de qualidade e em quantidade suficiente para posteriores análises (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010; OLSEN et al., 2012; WHITE et al., 2012; BARBOSA et al., 2013; SCHAEFER et al., 2013).

Quanto ao método de diagnóstico, a alta prevalência do PCV2 foi confirmada em diversos estudos pela utilização de métodos de PCR em amostras de sangue ou soro, técnicas de isolamento viral, imuno-histoquímica, hibridização in situ, Nested PCR (NPCR), e PCR em tempo real (ELLIS et al., 1999; ALLAN e ELLIS, 2000; LAROCHELLE et al., 2003; KIM e CHAE, 2003; SEGALÉS et al., 2005;

CIACCI-ZANELLA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; VILCEK et al., 2010; BEZERRIL et al., 2012; ZHENG et al., 2013; NIELSEN et al., 2018).

A literatura reporta ainda a aplicação com êxito da técnica de nested PCR em tubo único (STNPCR) para a detecção de diversos patógenos (ABATH et al., 2002; STANKECIVIUS et al., 2006; SOUZA et al., 2007; MENDES et al., 2008; PONTES et al., 2014).

Esta técnica foi otimizada e empregada no presente estudo, visando a obtenção de resultados reprodutíveis e isentos de contaminação, aplicáveis à pesquisa do PCV2, o que é reforçado por Abath et al. (2002), Souza et al. (2007) e Silva et al. (2012), que afirmam que na STNPCR a contaminação cruzada é drasticamente reduzida, devido à fixação do segundo par de primers na parte interna da tampa do tubo. Em um estudo utilizando amostras de tecidos (linfonodos e pulmão), Pontes et al. (2014) mostraram ainda que o consumo dos primers no primeiro estágio de amplificação não interferiu na cinética do segundo estágio da reação, e novamente não foram observadas reações cruzadas nas amostras. Essas conclusões corroboram com os resultados obtidos, onde não foram evidenciadas contaminações.

A técnica foi otimizada partindo dos parâmetros descritos por Souza e colaboradores (2007). Em estudo semelhante, Pontes et al. (2014) também conseguiu detectar com sucesso o PCV2 através da técnica de STNPCR. O tipo de amostra selecionada no presente estudo, diverge daquele selecionada nos trabalhos supracitados, que utilizaram amostras de tecidos, o que tornou necessária a modificação de parâmetros que teriam sido utilizados nos mesmos.

De acordo com Fernandes et al. (2008), uma reação de PCR tem que ser altamente equilibrada quanto às condições físicas em que a desnaturação ou a renaturação ocorrem, uma vez que condições de baixa estringência diminuem a especificidade da reação, resultando em amplificações inespecíficas. Pode-se considerar, entre os fatores críticos da reação, a concentração dos primers e a temperatura de anelamento, sendo estes parâmetros alterados e testados durante o processo de otimização das reações realizadas no presente estudo.

Segundo Scheinert e colaboradores (2003), uma alta concentração de primers aumenta a probabilidade de anelamento espúrio, gerando produtos não específicos e dímeros, no entanto a falta deste componente interfere na amplificação.

Vale ressaltar que, a especificidade da amplificação depende principalmente das condições empregadas na etapa de anelamento, como esta etapa envolve hibridação de oligonucleotídeos, a otimização desta temperatura representa um fator essencial para o sucesso do processo. Logo, o aumento da temperatura de anelamento durante o processo de otimização, teve como objetivo pontualmente aumentar a especificidade e rendimento da reação, uma vez que baixas temperaturas de anelamento aumentam a probabilidade de ocorrência de hibridizações inespecíficas, resultando na amplificação de diferentes regiões do DNA (MELO, 2006).

Os resultados da sensibilidade analítica demonstraram que a Nested PCR em tubo único realizada nesse estudo obteve alta sensibilidade, apresentando um limite de detecção de $2,8 \times 10^4$, corroborando com o estudo realizado por Pontes e colaboradores (2014), onde a STNPCR atingiu um limite de detecção de $2,5 \times 10^4$.

O achado de circovírus nas amostras testadas, comprovada pela amplificação do produto esperado, evidencia a eficácia da técnica na detecção do agente viral.

Antes da realização da técnica da STNPCR, foi realizada uma PCR direcionada ao gene da beta-actina suína. A utilização desta técnica apresenta notável importância ao permitir a avaliação da eficiência do DNA extraído, excluindo os falsos negativos, que podem ser decorrentes da não recuperação do DNA viral na extração, da falta de integridade do DNA ou por possíveis fatores de inibição da PCR (HUI et al., 2004; NYGARD et al., 2007; LI et al., 2010; CASTRO et al., 2013).

É possível encontrar na literatura, diversos estudos que utilizaram uma PCR direcionada ao gene da β -actina suína como critério de avaliação do material genético extraído (HUI et al., 2004; AYRAL et al., 2006; CAMARGOS et al., 2008; BIELANSKI et al., 2009; LI et al., 2010; CASTRO et al., 2013; GUIMARÃES et

al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). No presente estudo, este controle cumpriu seu papel, visto que todos os fragmentos de amostras testados foram positivos, e a aplicação da técnica permitiu selecionar as amostras viáveis para posteriores análises.

A respeito do controle da doença, embora muitos profissionais, empresas e granjeiros, equivocadamente, consideram a vacinação como a principal forma de controle, os fatores de manejos são os mais importantes para o controle da doença e devem ser aplicados meticulosamente. Testi e colaboradores (2014) ressaltam que medidas de higiene, racionalização do fluxo de animais entre as diferentes instalações e remoção precoce de animais doentes para áreas restritas, são tópicos que podem contribuir no controle da disseminação do vírus, bem como no impacto econômico que este representa. Ciacchi-Zanella e Morés (2003), evidenciam ainda que, para prevenir a entrada do PCV2 em granjas livres, deve-se seguir à risca medidas de biossegurança tanto externas, focando no controle de visitantes, veículos, acesso de animais e introdução de suínos e sêmen; quanto internas, levando em consideração o manejo das instalações e a redução de estresse.

7 CONCLUSÃO

O achado de PCV2 em suínos clinicamente saudáveis foi algo importante, visto que esse agente viral representa um problema para suinocultura industrial, causando desde a queda no desempenho dos animais até à sua morte.

Sendo a detecção do vírus imprescindível para a redução no expressivo impacto econômico que este é capaz de causar para os produtores, a padronização da técnica de STNPCR para a identificação da presença do PCV2 constitui uma ferramenta laboratorial importante para a suinocultura da região.

Vale ressaltar que a padronização e desenvolvimento de novos sistemas de PCR tornam seu custo financeiro mais acessível. Nesse contexto, a STNPCR, otimizada para fluido oral, para detecção do *Circovírus* suíno 2 nas amostras clínicas, demonstrou alta sensibilidade, especificidade e ausência de contaminação, produzindo resultados confiáveis e tornando o método reprodutível para outras análises epidemiológicas envolvendo o vírus.

Na avaliação do custo-benefício da STNPCR como exame laboratorial para confirmação da presença do PCV2, devemos levar em consideração a sensibilidade de detecção do método e a rapidez no resultado, fatores que favorecem a instituição precoce do tratamento adequado e atenuação da cadeia de transmissão.

Evidencia-se ainda, a importância de se realizar uma investigação diagnóstica detalhada das granjas em que há ocorrência de PCVADs, visando à adoção ou intensificação de estratégias de intervenção eficientes. Destaca-se a alta relevância que a vacinação representa para enfermidades passíveis de prevenção, como é o caso da circovirose, o que torna esta prática essencial no controle de infecções como essa.

O presente estudo conseguiu detectar o circovírus nas amostras testadas, evidenciando a eficácia da técnica padronizada. Entretanto novos estudos precisam ser desenvolvidos no intuito de consolidar os resultados aqui apresentados, quanto a este novo tipo de amostra associado a esta técnica.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas de trabalhos futuros a respeito do *Circovírus* suíno 2 e suas técnicas de diagnóstico fundamentam-se em estudos que possam otimizar e reportar a aplicação com êxito dos métodos para identificação viral, auxiliando na tomada de medidas de biossegurança mais eficazes contra este patógeno.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.C.; MELO, F.L.; WERKHAUSER, R.P.; MONTENEGRO, L.; MONTENEGRO, R.; SCHINDLER, H.C. **Single-tube Nested-PCR using immobilized internal primers**. *Bio Techniques*, 33: 1210-1214, 2002.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório ABPA 2017**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>.
- AFOLABI, K.O.; IWERIEBOR, B.C.; OKOH, A.I.; OBI, L.C. **Global Status of Porcine Circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa**. *Advances in Virology*, 2017:6807964, 2017.
- ALLAN, G.M.; PHENIX, K.; TODD, D.; MCNULTY, M. **Some biological and physicochemical properties of porcine Circovirus**. *Journal of Veterinary Medicine B*, 41:17– 26, 1994.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. **Porcine circoviruses: a review**. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p.3–14, 2000.
- AMARAL, A.L.; SILVEIRA, P.R.S.; LIMA, G.J.M.M.; KLEIN, C.S.; PAIVA, D.P.; MARTINS, F.; et al. **Boas Práticas de produção de suínos**. Circular Técnica 50. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 60 p.; 2006.
- ARIEL, P.; PABLO, P.; ANA, B.; MARÍA, A.Q.; DANILO, B.; MARÍA, I.C.; et al. **Genetic Characterization of Porcine Circovirus Type 2 from Pigs with Porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina**. *ISRN Vet sci*, 2011, 2011: 560905.
- ASSAYAG JR., M.S.; LARA, A.N. **Fatores que podem interferir na resposta vacinal de Circovírus tipo 2**. *Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos*, 2017. Anais do X SINSUI, Porto Alegre, RS, 203-205, 2017.
- AYRAL, A. M.; CLARKSON, S.; CHEESEMAN, M. *et al.* **A panel of optimized primers and positive-control DNAs for PCR detection of common biological contaminants in mouse cell lines and tissue samples**. *Lab. Anim.*, 35(8):31-36, 2006.
- BAEKBO, P.; KRISTENSEN, C.S.; LARSEN, L.E. **Porcine Circovirus diseases: A review of PMWS**. *Transbound. Emerg. Dis.* 59:60–67, 2012.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; TAKEUTI, K.L.; ALMEIDA, L.L.; OLIVEIRA FILHO, J.X. **Interação entre agentes infecciosos bacterianos e virais no complexo das doenças respiratórias dos suínos**. *Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos*. Anais do X SINSUI, Porto Alegre, RS, 129-139, 2017.
- BARBOSA, C. N. **Circovírus suíno tipo-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos**. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas Gerais, 2005.

BARBOSA, C.N.; FREITAS, T.R.P. **Implementação da técnica de imunohistoquímica (IHQ) para o diagnóstico do circovírus suíno tipo-2 (CVS-2).** Revista Ciências Médicas e Biológicas, 7:211-219, 2008.

BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; MARTINS, N.R.S.; NASCIMENTO, E.F. **Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 60(4):815-820, 2008.

BARBOSA, C.N.; MARTINS, N.R.; ESTEVES, E.G.; FREITAS, T.R.P. **Pesquisa de antígenos e anticorpos contra Circovírus suíno II em suínos com e sem sintomatologia da síndrome multisistêmica do definhamento em granjas comerciais mineiras.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 32(4):1513-1526, 2011.

BARBOSA, C.N.; BAPTISTA, R.I.A.A.; CUNHA, D.F.; FREITAS, T.R.P. **Aplicação da metodologia de coleta do fluido oral em suínos mestiços.** Medicina Veterinária, Recife, 7(3):32-38, 2013.

BARBOSA JÚNIOR, S. A.; BAPTISTA, R. I. A. de A.; BARBOSA, C. N. **Fisiologia comparada do fluído oral e suas principais aplicações clínicas.** Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, 18(4): p. 259-268, 2015.

BEZERRIL, J.E.; MACHADO, J.P.; SILVA, F.M.F.; BULOS, L.H.S.; VILORIA, M.I.V.; ALMEIDA, M.R. **Avaliação da coinfeção do circovírus suíno 2 com *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmões coletadas em abatedouro na região da Zona da Mata.** ARS Veterinaria, Jaboticabal, SP, 28(3):195-201, 2012.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, J.; LALONDE, A. *et al.* **Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring.** Theriogenology, 71(3):499-508, 2009.

BORTOLETTO, C.; FERREIRA, G.F.; GASSER, B.; NAKAMURA, A.M.; ALMEIDA, H.M.S.; OLIVEIRA, L.G. **Principais causas de problemas reprodutivos em porcas.** Rev Científica de Med Vet, 23, 2014.

CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA, A. M.; FONSECA JUNIOR, A. A. *et al.* **Aplicação da reação em cadeia da polimerase para detecção de *Mycoplasma spp* na rotina de cultivos celulares.** Ciênc. Anim. Bras., 9(1):786-790, 2008.

CARMAN, S.; MCEWEN, B.; DELAY, J.; VAN DREUMEL, T., LUSIS, P.; CAI, H.; FAIRLES, J. **Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005).** Canada Veterinary Journal, 47, 761–762, 2006.

CASTRO, A.M.M.G.; RUIZ, V.L.A.; CASTRO JR., F.G.; BERSANO, J.G.; MORENO, A.M.; CORTEZ, A. **Detecção e diferenciação de circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos do estado de São Paulo.** In: Anais Congr. Bras. Vet. Especialistas em Suínos, Goiânia, p.107-108, 2003.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; BRANDÃO, P.; RICHTZENHAIN, L.J. **Artigo de revisão: circovírus suíno tipo 2 (PCV2).** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 74(3):281-291, 2007.

CASTRO, A.M.M.G.; CASTRO JÚNIOR, F.G.; MORI, C.K.; CRUZ, T.F.; BALDIN, C.M.; BUDINO, F.E.L.; et al. **Obtenção de animais negativos para Circovírus suíno 2 oriundos de granjas positivas: estratégia de manejo.** Arq. Inst. Biol. 80(4):393-399, 2013.

CIACCI-ZANELLA, J.R. E MORÉS, N. PCVD. In: **Circular Técnica 37.** EMBRAPA/CNPAS, Concórdia, Santa Catarina, pp1-12, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. **Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil.** Ciência Rural, 36(5):1480-1485, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J. R; SIMON, N. L; PINTO, L. S; VIANCELLI, A; FERNANDES, L. T; HAYASHI, M. DELLAGOSTIN OA, ESTEVES PA. **Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population.** Research in Veterinary Science, v. 87, p. 157-160, 2009.

CHIARELLI-NETO, O.; CASTRO, L.A.; SILVA, F.M.F.; BONFA, G.; SILVA JUNIOR, A.; MORAES, M.P.; ALMEIDA, M.R. **Isolation of porcine circovirus type 2 (pcv) in animals from Espírito Santo state.** Virus Reviews & Research Journal of the Brazilian Society for Virology, Rio de Janeiro, v.10, 2005.

CHIARELLI-NETO, O.; SILVA JUNIOR, A.; VIDIGAL, P.M.P.; SALGADO, R.L.; SILVA, F.M.F.; RISTOW, L.E.; FIETTO, J.L.R.; ALMEIDA, M.R. **Diversidade molecular de diferentes isolados brasileiros do circovírus suíno 2.** In: Anais Congr. Bras. Vet. Especialistas em suínos, Florianópolis, 2007.

CHIARELLI-NETO, O. **Filogeny and filogeografy of porcine circovirus 2 (PCV2), construction and characterization of a recombinant adenovirus that express capsid protein of PCV2.** 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CHOI, C.; CHAE, C.; CLARK, E.G. **Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction.** J. Vet. Diagn. Invest. 12:151-153, 2000.

CHOI, J.; STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; HARRACH, B.; ANOTHAYANONTHA, L.; KANITZ, C.L.; MITTAL, S.K. **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, 2002.

- CLARK, E.G. **Post weaning multisystemic wasting syndrome**. Proc. American Association of Swine Pract. 28:499-501, 1997.
- CORREA, A.M.; PESCADOR, C.A.; SCHMITZ, M.; ZLOTOWSK, P.; ROZZA, D.B.; OLIVEIRA, E.C. **Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 26(1), 9-13, 2006.
- COSTA, G.; OLIVEIRA, S.; TORRISON, J. **Detection of Actinobacillus pleuropneumoniae in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs**. J Swine Health Prod., v.20, n.2, p.78-81, 2012.
- CURY, A. **O vendedor de sonhos – o chamado**: 5 ed. Academia, 2008.
- DEZEN, D. **Desenvolvimento de uma vacina recombinante para circovirose suína e ensaios para diagnóstico molecular de PCV2**. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BEKBO, P.; LARSEN, L. E. **Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS casecontrol study supports a shift in genotypes with time**. Veterinary Microbiology, Amsterdam, 128(1):56-64, 2008.
- ELLIS, J.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. **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)**. Journal of Virological Methods, 80:123-128, 1999.
- FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S.B.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K. **The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex**. Vaccine, 26:1488-1499, 2008.
- FANE, H.; XIAO, S.; TONG, T.; WANG, S.; XIE, L.; JIANG, Y.; et al. **Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments**. Mol. Immunol., 45, 653–660, 2008.
- FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. **A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV-2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV-1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs**. Journal of Virology, 78:6297-6303, 2004.
- FENG, H.; BLANCO, G.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M. **Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination?** Veterinary Microbiology, 172(1-2):92– 99, 2014.
- FERNANDES, P.R.; SILVA, A.C.; GAMBARINI, M.L.; LINHARES, G.F.C. **Construção de iniciadores e otimização de ensaios de PCR e de**

nested-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus*. Rev Bra. Parasitol Vet. 17(3):133-138, 2008.

FERNANDES, L.M.C.G.R. **Avaliação de um programa de vacinação de circovirose suína numa exploração de produção intensiva.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2017.

FORT, M; SIBILA, M; ALLEPUZ, A; MATEU, E; ROERINK, F; SEGALÉS, J. **Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins.** Vaccine, Surrey, 26:1063-1071, 2008.

FORT, M. **Atualidades no circovírus suíno tipo 2 (PCV2).** Revista Suíno & Cia, ano VI, 35:26-39, 2010.

FRANÇA, T.N.; RIBEIRO, C.T.; CUNHA, B.M.; PEIXOTO, P.V. **Circovirose Suína.** Pesq. Vet. Bras., 25(2):59-72, 2005.

FUX, R.; SÖCKLER C.; LINK, E.K.; RENKEN, C.; KREJCI, R.; SUTTER, G.; et al. **Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains.** Virology Journal, 15:25, 2018.

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

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

GAVA, D.; ZANELLA, E.L.; MORES, N.; CIACCI-ZANELLA, J.R. **Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues.** Pesq. Vet. Bras., 28(1), 2008.

GASTARDELO, T.A.R.; MELZ, L.J. **A suinocultura industrial no mundo e no Brasil.** Rev UNEMAT de Contabilidade, v.3, 72-92, 2014.

GIMÉNEZ-LIROLA, L.G.; XIAO, C.T.; ZAVALA, M.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. **Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection.** J Microbiol Methods, 92:113-121, 2013.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. **A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence.** Veterinary Microbiology, Amsterdam, 128(2):23–35, 2008.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE L.; SEGALÉS, J. **Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine Circovírus type 2.** The Veterinary Journal, 187: 23–32, 2011.

GHEBREMARIAM, M.K.; GRUYS, E. **Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures.** A review. Vet Q., 27(3):105-16, 2005.

GUIMARÃES, A.M.S.; BIONDO, A.W.; LARA, A.C.; MESSICK, J.B. **Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil.** The Veterinary Record, 160:50-53, 2007.

GUO, L.J.; LU, Y.H.; WEI, Y.W.; HUANG, L.P.; LIU, C.M. **Porcine Circovirus type 2 (PCV2); genetic variation and newly emerging genotypes in China.** Virology Journal. 7:273-284, 2010.

HAAS, D.J.; TORRES, A.C.D. **Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais.** Revista científica de medicina veterinária, 26. 2016. ISSN:1679-7353.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P.S. **Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs.** Journal of Virology, 72(6):5262-5267, 1998.

HANSEN, M.S.; HJULSAGER, C.K.; BILLE-HANSEN, V.; HAUGEGAARD, S.; DUPONT, K.; HØGEDAL, P. **Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures.** Vet Microbiol, 144:203–209, 2010.

HARDING, J.C.S.; CLARK, E.G.; STROKAPPE, J.H.; WILLSON, P.I.; ELLIS, J.A. **Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation.** J Swine Health Prod., 6:249-254, 1998.

HARDING, J.C. **The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2.** Vet. Microbiol. 98(2):131-5, 2004.

HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R. R. **Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field.** Virus Research, v.7, 2008.

HUI, R.K.H.; ZENG, F.; CHAN, C.M.N.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, J.S.M.; LEUNG, F.C.C. **Reverse Transcriptase PCR Diagnostic Assay for the Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome.** J Clin Microbiol., 42(5):1994–1999, 2004.

JANTAFONG, T.; BOONSOONGNERN, A.; POOLPERM, P.; URAIRONG, K.; LEKCHAROENSUK, C.; LEKCHAROENSUK, P. **Genetic characterization of porcine Circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and-negative farms in Thailand.** Virology Journal, 8:88, 2011.

JOISEL, F.; CHARREYRE, C.; COULOMBE, L.; Noël, J.C.; LONGO, S. **Vaccination of Sows and Gilts against PCV2 Diseases: Field Experiences in Europe.** Advances in Pork Production, 19:183, 2008.

KEDKOVID, R.; WOONWONG Y.; ARUNORAT J.; SIRISEREewan C.; SANGPRATUM N.; LUMYAI M.; et al. **Porcine circovirus type 3 (PCV3)**

- infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC).** Vet Microbiol., 215: 71-76, 2018.
- KEKARAINEN, T.; MCCULLOUGH, K.; FORTA, M.; FOSSUM, C.; SEGALÉS, J.; ALLANE, G.M. **Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine Circovirus type 2.** Veterinary Immunology and Immunopathology, 136:185–193, 2010.
- KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. **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, 2001.
- KIM, J.; CHAE, C. **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, 2003.
- KITTAWORN, A.; WANG, C.; ANDRESON, G.; BALLAGI, A.; BROES, A.; CARMAN, S.; et al. **Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay.** J Vet Diagn Invest., 24(6):1057-1063, 2012.
- KNOW, T.; LEE, D.; YOO, S.J.; JE, S.H.; SHIN, J.Y.; LYOO, Y.S. **Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population.** Virus Res, 228:24-29, 2017.
- KRISTENSEN, C.S.; BAADSGAARD, N.P.; TOFT, N. **A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter.** Prev Vet Med, 98(4):250-8, 2011.
- LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M.; MAGAR, R. **Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR.** Journal of Virological Methods, p. 69-75, 1999.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. **Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome.** Canadian Journal of Veterinary Research, 67:114-120, 2003.
- LI, Z.; YANG, L.; WANG, J.; SHI, W.; PAWAR, R.A.; LIU, Y.; et al. **β -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*.** Fish & Shellfish Immunology, 29:89-93, 2010.
- LIMA, J.F.C. **Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina através da Nested-PCR em único tubo.** 64f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L. A. **Quantitative, Competitive PCR Analysis of Porcine Circovirus DNA in Serum from Pigs with Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome.** Journal of Clinical Microbiology, 38(9):3474-3477, 2000.

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. **The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo.** Journal Virology, 80(10):5065-5073, 2006.

LIU, J.; WEY, C.; YANG, X.; DAI, A.; LI, X. **Simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus type 2, type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine parvovirus and pseudorabies virus in pigs with postweaning.** Veterinarski Arhiv, 85 (5), 511-521, 2015.

LÓPEZ-SORIA, S.; GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. **Epidemiología de la circovirosis porcina.** Suis, 49, 14-23, 2008.

LÓPEZ-SORIA, S.; NOFRARÍAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; ESPINAL, A.; VALERO, O.; RAMÍREZ-MENDOZA, H.; et al. **Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background.** Vet Microbiol, 149(3-4):352-7, 2011.

LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J. **Propriedades do vírus PCV2 e suas implicações.** 26 Nov, 2013. Disponível em: <https://www.3tres3.com.pt/print/7127>.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; et al. **Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observation from follow-up studies on affected farms.** Livestock Production Science, v. 63, p. 223-233, 2000.

MADSON, D. M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X.J.; OPRIESSNIG, T. **Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with Porcine circovirus type 2.** Veterinary Pathology, v. 46, p. 707-716, 2009.

MANKERTZ, A.; CALISKAN, R.; HATTERMANN, K.; HILLENBRAND, B.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; et al. **Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication.** Veterinary Microbiology, v.98, p. 81-84, 2004.

MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V.A.; ELLIS, J.A.; et al. **Characterization of novel Circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs.** Journal of General Virology, 79:2171– 2179, 1998.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de Métodos Moleculares Baseados em PCR para a detecção de Schistosoma Mansoní.** Tese de Doutorado em Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, 2006. 114 p.

- MENDES, C.L.; ABATH, F.G.C.; LEAL, N.C. **Development of a multiplex singletube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection.** J. Microbiol. Methods, 72:191–196, 2008.
- MORÉS, N.; AMARAL, A. L.; ZANELLA, J.R.C.; CORDEBELLA, A.; BORDIN, L.C.; OLIVEIRA, S.; GAVA, D.; RANGEL L.F.S. **Uso do plasma suíno ultrafiltrado na recuperação de leitões com sinais clínicos de circovirose.** Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia, 59(5):1124-1131, 2007.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; MORGAN, M.K.; YOON, K.J.; PAUL, P.S. **Detection of a Novel Strain of Porcine Circovirus in Pigs with Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome.** Journal of Clinical Microbiology, 36(9):2535- 2541, 1998.
- NASCIMENTO, J. A. F. B. **Análise filogenética do circovírus suíno tipo 2 no Brasil.** 127f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- NILSEN, G.B.; NIELSEN, J.P.; HAUGEGAARD, J.; LETH, S.C.; LARSEN, L.E.; KRISTENSEN, C.S.; et al. **Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs.** Porcine Health Management, 4:2, 2018.
- NYGARD, A.; JØRGENSEN, C.B.; CIRERA, S.; FREDHOLM, M. **Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR.** BMC Molecular Biology, 8:67, 2007.
- OLIVEIRA FILHO, J.X.; CHITARRA, C.S.; PAULA, D.A.J.; GODOY, I.; SILVA, M.C.; COLODEL, E.M.; et al. **Ocorrência de Circovírus suíno tipo 2 em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 4, p. 363-366, 2009.
- OLIVER-FERRANDO, S.; SEGALÉS, J.; LÓPEZ-SORIA, S.; CALLÉN, A.; MERDY, O.; JOISEL, F.; et al. **Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages.** Vet Res, 47:121, 2016.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. **Porcine Circovirus Type 2 Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19(6):591-615, 2007.
- OPRIEESNIG, T.; XIAO, C.T.; GERBER, P.F.; HALBUR, P.G. **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, 2013.
- OLSEN, C., COETZEE, J., KITTAWORNARAT, A., MAIN, R. **Effect of sample collection material on detection of PRRSV antibody in oral fluid.** In: 22nd IPVS Proceedings, Jeju, 2012.

- PARK, C., SEO, H.W.; PARK, S.J.; HAN, K.; CHAE, C. **Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.** Journal of General Virology, 95, 2486–2494, 2014.
- PAXSON, J. **Polymerase chain reaction test interpretation. Compendium: Continuing Education for Veterinarians.** p. 186–196, 2008.
- PESCADOR, C.A.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. **Principais lesões histopatológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos do Rio Grande do Sul.** In: Congr. Bras. Vet. Especialistas em Suínos, Resumos, Goiânia, p.105-106, 2003.
- PINTO, F.F.; LOBATTO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; ROCHA M.A.; BARBOSA C.N. **Deteção do circovírus suíno 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do Estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).** In: Congr. Bras. Vet. Especialistas em suínos, Resumos, p. 103-104, 2003.
- PONTES, N.E.; BARBOSA, C.N.; JESUS, A.L.; SILVA, J.G.; FREITAS, A.C. **Development and evaluation of single-tube nested PCR (STNPCR) for the detection of porcine circovirus type 2 (PCV2).** Transbound Emerg Dis. 61(3):233-8, 2014.
- PRICKETT, J.R.; KIM, W.; SIMER, R.; et al. **Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections.** J Swine Health Prod, 16(2):86–91, 2008.
- PRICKETT, J.R., ZIMMERMAN, J. **The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine.** Animal Health Research Reviews. 11:207-216, 2010.
- QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; et al. **Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.** Veterinary Record, Londres, 149(12):357–361, 2001.
- RIBEIRO, E.L.; OLIVEIRA, A.G.G.; LANGUARDIA-NASCIMENTO, M.; MATA, C.P.S.M.; REIS, J.K.P.; FONSECA JÚNIOR, A.A. **Estudo comparativo e validação de três técnicas de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico de Peste Suína Africana.** Pesq Vet Bras, 36(6):473-478, 2016.
- RODRIGUES, G. Z.; GOMES, M. F. M.; CUNHA, D. A.; SANTOS, V. F. **Evolução da produção de carne suína no brasil: uma análise estrutural-diferencial.** Rev de economia e agronegócio, 6 (3):343-366. 2009.
- SARAIVA, G.L.; VIDIGAL, P.M.P.; FIETTO, J.L.R.; BRESSAN, G.C.; SILVA JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M.R. **Evolutionary analysis of Porcine circovirus 3**

(PCV3) indicates an ancient origin for its current strains and a worldwide dispersion. Virus Genes, 54(3):376-384, 2018.

SCHAEFER, R.; RECH, R.R.; SILVA, M.C.; GAVA, D.; CIACCI-ZANELLA, J.R. **Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos.** Pesq Vet Bras, 33(1):61-73, 2013.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. **Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®.** Eppendorf North America, 2003.

SEGALÉS, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DEL POZO, M.; NOVAL, R.; et al. **First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pig in Spain.** Vet Rec, 141:600-601, 1997.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. **Porcine Circovirus diseases.** Animal Health Research Reviews, 6(2): 119–142, 2005.

SEGALÉS J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; et al. **PCV-2 genotype definition and nomenclature.** Veterinary Record, Londres, v. 162, p. 867-868, 2008.

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

SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. **PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab and feces from experimentally infected pigs and field cases.** Journal of Veterinary, 65(3):405-408, 2003.

SILVA, M.A.L. **Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral.** 99f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

SILVA, M.A.; SOARES, C.R.P.; MEDEIROS, R.A.; MEDEIROS, Z.; MELO, F.L. **Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis.** Exp. Parasitol., 134(2):206-10, 2013.

SONG, Y.; JIN, M.; ZHANG, S.; XU, X.; XIAO, S.; CAO, S.; et al. **Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2.** Vet Microbiol., 119, 97–104, 2007.

SOUZA, G.; ABATH, F.G.C.; LEAL, N.C.; FARIAS, A.; ALMEIDA, A. **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, 2007.

SOUZA, J.C.P.V.B.; TALAMINI, D.J.D.; SCHEUERMANN, G.N.; SCHMIDT, G.S. (Ed.). **Sonho, desafio e tecnologia: 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves.** Livro técnico. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p. 85-102, 2011.

SOUZA, N.N.; LOBATO, Z.I.P.; GUEDES, R.M.C. **Estudo retrospectivo de diagnóstico de circovirose suína pela técnica de imuno-histoquímica.** Arq. Inst. Biol., 75 (4), p.521-525, 2008.

STADEJECK, T.; WOZNIAK, A.; MILEK, D.; BIERNACKA, K. **First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland.** Transbound Emerg Dis., 64(5):1350-1353, 2017.

STANKECIVIUS, A.; WASYL, D.; JABLONSKI, A.; STANKEVICIENE, M.; PEJSAK, Z. **Onetube nested PCR the detection of Salmonella sp. in swine faeces.** Bull Vet Inst Pulawy, 50:35-39, 2006.

STONE, M. **Response to first diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome.** Surveillance, 31(7), 2004.

TAKEUTI, K.L.; BARCELLOS, D.E.S.N. **O que há de novo sobre a infecção por Mycoplasma hyopneumoniae em suínos.** Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos, 2017. Anais do X SINSUI, Porto Alegre, RS, 111-118, 2017.

TESTI, A.; SAMPAIO, P.H.; OLIVEIRA, M.E.F.; SAMARA, S.I.; OLIVEIRA, L.G. **Estratégias de controle da Circovirose Suína.** Rev Cient Med Vet, Ano XII, n.22, 2014.

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

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry:** World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, 12 out. 2016. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-andpoultry-world-markets-and-trade>.

VAZ, E.K. **Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura.** Acta Scien. Vet. 37 (1), 147-150, 2009.

VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR:** Aplicações e Padronização de Reações. 2011. Disponível em: <<https://www.imtsp.fm.usp.br/>> Acesso em: 15 de janeiro de 2018.

VILCEK, S.; VLASAKOVA, M.; JACKOVA, A. **LUX real-time PCR assay for the detection of porcine Circovirus type 2.** Journal of General Virology, 165:216-221, 2010.

WHITE, D., ROTOLO, M., OLSEN, C., PRICKETT, J. **Pig behavior and the contribution of individual pigs to pen-based oral fluids samples.** In: 22nd IPVS Proceedings, Jeju, 2012.

YANG, Z.; MUDASSER, H.; JIANG-BING, S.; WEI-HUAN, F. **Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR.** Journal of Zhejiang Univ. Sci. B. 8:162–169, 2007.

ZANELLA, J.R.C.; MORES, N.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C.
Diagnóstico molecular e caracterização do Circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. Anais da Abraves, Porto Alegre, RS, 97-98, 2001.

ZANELLA, J.R.C. **Circoviridae**, In: Flores, E. F., Virologia Veterinária. ed ufsm, cap. 17, p. 433-488, 2007.

ZHAI, S.L.; CHEN, S.N.; WEY, Z.Z.; ZHANG, J.W.; HUANG, L.; LIN, T.; et al.
Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. Virol J. 13(8):517, 2011.

ZHENG, L.; WANG, Y.; LI, M.; CHEN, H.; GUO, X.; GENG, J.; et al.
Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine Circovírus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. J Virol Methods, 187:15-19, 2013.

WANG, K.; HUANG, L.; KONG, J.; ZHANG, X. **Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in Lactococcus lactis for oral vaccination.** J Virol Methods, 150:1–6, 2008.

ANEXO A - APLICAÇÃO DO MÉTODO APÓS TESTES DE OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA O PAR BETA-ACTINA EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL

TESTE PRIMER BETA-ACTINA

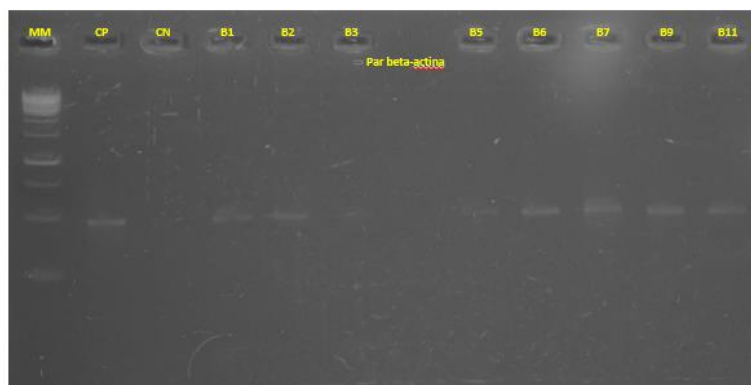
PRIMER PARES: PAR BETA-ACTINA

PROGRAMA DE CICLAGEM:

CONDIÇÕES DA REAÇÃO:

ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	COMPONENTES	QUANTIDADE (µl)	CONCENTRAÇÃO
HOLD	95	2 min	H2O	12,8	
CYCLE	94	15s	Reaction buffer	5,0	1,5 mM
STEP1			dNTPs	1,0	0,4 mM
CYCLE	58	1 min	PRIMER F	0,6	0,24 µM
STEP2			PRIMER R	0,6	0,24 µM
CYCLE	72	1 min	Taq	1,0	0,025 u/µL
STEP3			TEMPLATE	4,0	
HOLD 2	72	1 min			
Nº de CICLOS	30				

CONTROLE NEGATIVO: SOMENTE O MIX



TAMANHO DAS BANDAS:

PAR BETA-ACTINA: 478 pb

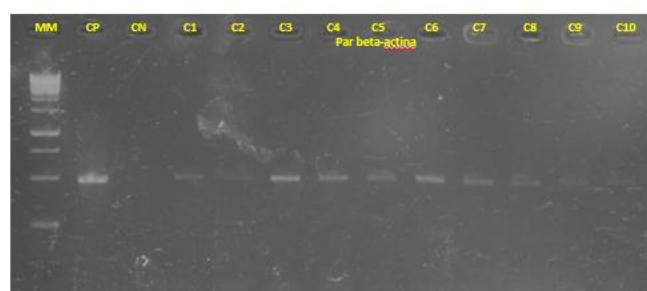
LEGENDA DAS AMOSTRAS:

CN = Branco (mix + água)

MM 1kb= Marcador 1000pb

CP = Amostra de suíno com PCV2 (tecido)

Amostras utilizadas: B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B11.



TAMANHO DAS BANDAS:

PAR BETA-ACTINA: 478 pb

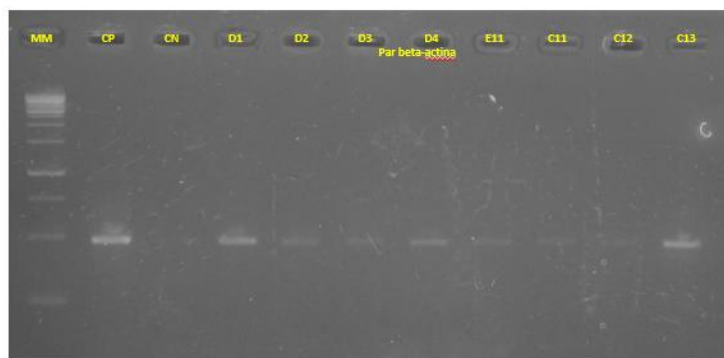
LEGENDA DAS AMOSTRAS:

CN = Branco (mix + água)

MM 1kb= Marcador 1000pb

CP = Amostra de suíno com PCV2 (tecido)

Amostras utilizadas: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12.



TAMANHO DAS BANDAS:
PAR BETA-ACTINA: 478 pb

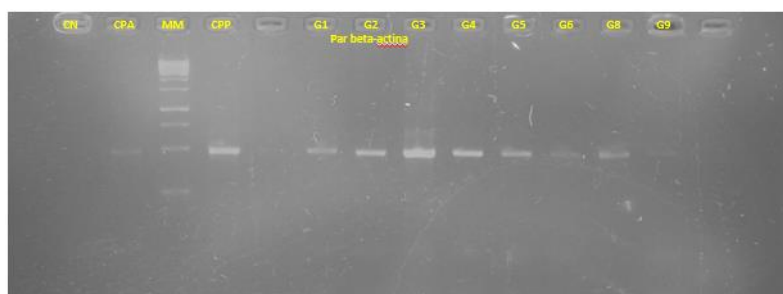
LEGENDA DAS AMOSTRAS:

CN = Branco (mix + água)

MM 1kb= Marcador 1000pb

CP = Amostra de suíno com PCV2 (tecido)

Amostras utilizadas: D1, D2, D3, D4, E11, C11, C12, C13.



TAMANHO DAS BANDAS:
PAR BETA-ACTINA: 478 pb

LEGENDA DAS AMOSTRAS:

CN = Branco (mix + água)

CPA = Amostra de suíno saudável*

MM 1kb= Marcador 1000pb

CPP = Amostra de suíno com PCV2 (tecido)

Amostras utilizadas: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8 e G9.