UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

ANA CLAUDIA DE MENEZES CRUZ

ESTUDO MOLECULAR DOS CIRCOVIRUS SUÍNO TIPOS 2 E 3 EM SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Niterói, RJ
2019

ANA CLAUDIA DE MENEZES CRUZ

ESTUDO MOLECULAR DOS CIRCOVIRUS SUÍNO TIPOS 2 E 3 EM SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Virologia

Orientadores: Prof.ª Dr.ª TATIANA XAVIER DE CASTRO

Prof. Dr. RENATO LUIZ SILVEIRA

Niterói, RJ

2019

ANA CLAUDIA DE MENEZES CRUZ

ESTUDO MOLECULAR DOS CIRCOVIRUS SUÍNO TIPOS 2 E 3 EM SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Virologia

Aprovada em 28 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª Drª Tatiana Xavier de Castro – UFF

_____

Profª Drª Fabiana Batalha Knackfuss - UNIGRANRIO

_____

Prof. Dr. Alexandre de Pina Costa – UNIGRANRIO

_____

Profª Drª Adriana de Abreu Corrêa - UFF

_____

Profª Drª Carmen Baur Vieira - UFF

Niterói, RJ

2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

C955e Cruz, ANA CLAUDIA DE MENEZES
ESTUDO MOLECULAR DOS CIRCOVIRUS SUÍNO TIPOS 2 E 3 EM SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO E ESPÍRITO SANTO, BRASIL / ANA CLAUDIA DE MENEZES Cruz ; TATIANA XAVIER DE CASTRO, orientador ; RENATO LUIZ SILVEIRA, coorientador. Niterói, 2019.
122 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019.

DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2019.d.73279978734

1. MICROBIOLOGIA. 2. VIROLOGIA. 3. CIRCOVIROSE. 4. SUÍNOS. 5. Produção intelectual. I. CASTRO, TATIANA XAVIER DE, orientador. II. SILVEIRA, RENATO LUIZ, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Vanja Nadja Ribeiro Bastos - CRB7/2522

Aos amores da minha vida Mariana, Caio, Pedro e Renato

que me fazem seguir em frente

AGRADECIMENTOS

Aos Espíritos de Luz, que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu marido Renato, meu maior incentivador e que nunca me deixa desistir.

Aos meus filhos, que entendem e respeitam minha necessidade de estudar.

Aos meus orientadores Tatiana Xavier de Castro e Renato Luiz Silveira, que seguiram juntos comigo nesse mundo da pesquisa.

Às minhas companheiras do Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, Ingrid e Amanda, pelas diversas tentativas efetuadas e vitórias alcançadas.

Aos professores Silvia Cavalcanti e Rafael Varella, pelo apoio dado à equipe PCV.

À professora Fabiana Batalha, pelas análises realizadas e por ter me ajudado a desvendar o mundo da bioestatística.

Ao professor Guilherme Nunes pela realização das análises estatísticas.

À Anna Soares, secretária do MIP, pela ajuda dada ao longo de seis anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA/UFF), pela atenção dispensada durante minha passagem pelo curso.

Aos membros da banca, pela presença e disposição em tornar esse trabalho melhor.

Aos funcionários das propriedades visitadas, pela ajuda dada nas coletas das amostras.

À Universidade Federal Fluminense pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação do Núcleo de Animais de Laboratório por ter me permitido realizar o doutorado.

RESUMO

A suinocultura moderna se caracteriza por confinar grande número de animais, propiciando ambiente favorável para a transmissão de agentes infecciosos. Dentre estes, destacam-se os circovírus suínos tipos 2 (PCV-2) e 3 (PCV-3), que estão associados à perda de peso, síndrome da dermatite e nefropatia suína e problemas reprodutivos. O PCV-2 causa significativa perda econômica para a indústria de suínos no Brasil e no mundo, o que torna o diagnóstico preciso das infecções por esse vírus altamente importante para a implementação de ações de manejo nos rebanhos afetados. O PCV-3 foi recentemente descrito a partir de casos de perdas reprodutivas e inflamação multissistêmica, e ainda há poucas informações disponíveis nos rebanhos brasileiros. O objetivo deste trabalho foi realizar a comparação entre as técnicas de qPCR e *nested* PCR na detecção do PCV-2, e o desenvolvimento de uma técnica de *nested* PCR para detecção molecular do PCV-3, a partir de amostras de soro de suínos coletadas nos estados do Rio de Janeiro e Espirito Santo, Brasil. Para isso, foi implementada uma qPCR para detecção e quantificação de PCV-2 no Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, UFF, que foi aplicada para avaliação da associação entre carga viral e manifestações clinicas, além da comparação com a *nested* PCR já utilizada no mesmo laboratório, e uma *nested* PCR para detecção de PCV-3, que foi posteriormente utilizada no estudo molecular para este vírus. A qPCR apresentou 38,92% de positividade. Entretanto, não foi observada diferença estatística com a *nested* PCR (40,26%). Uma associação estatística foi observada entre a carga viral sérica do PCV-2 e a presença de animais com diarreia. Em relação ao *nested* para PCV-3, o par de iniciadores desenhado para esse estudo apresentou um limite de detecção superior a reação de PCR inicialmente utilizada. Esse vírus foi detectado em 26,62% das amostras, tendo sido observada uma associação estatística entre o PCV-3 e animais assintomáticos, o que sugere que o vírus possa causar infecções subclínicas.

Palavras-chave**:** PCV-2, PCV-3, qPCR, *nested* PCR, soro, suíno

ABSTRACT

Modern pig farming is characterized by confining large numbers of animals, providing a favorable environment for the transmission of infectious agents. These include porcine circoviruses types 2 (PCV-2) and 3 (PCV-3), which are associated with weight loss, porcine dermatitis and nephropathy syndrome, and reproductive problems. PCV-2 causes significant economic loss to the swine industry in Brazil and around the world, which makes the accurate diagnosis of this virus infection highly important for the implementation of management actions in affected herds. PCV-3 has been recently described from cases of reproductive loss and multisystem inflammation, and there is still little information available in Brazilian herds. The objective of this work was to compare the qPCR and *nested* PCR techniques for PCV-2 detection and the development of a *nested* PCR technique for molecular detection of PCV-3 from swine serum samples collected in the states of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. For this, a qPCR for PCV-2 detection and quantification was implemented at the Animal Virology and Parvovirus Laboratory, UFF, which was applied to evaluate the association between viral load and clinical manifestations, and comparison with *nested* PCR already used in the laboratory, and a *nested* PCR for PCV-3 detection, which was later used in the molecular study for this virus. The qPCR presented 38.92% positivity. However, no statistical difference was observed between the two assays. A statistical association was observed between PCV-2 serum viral load and the presence of animals with diarrhea. Regarding *nested* for PCV-3, the pair of primers designed for this study had a detection limit higher than the PCR reaction initially used. This virus was detected in 26.62% of the samples, and a statistical association between PCV-3 and asymptomatic animals was observed, suggesting that the virus may cause subclinical infections.

Keywords: PCV-2, PCV-3, qPCR, *nested* PCR, serum, swine

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, f. 12
2 REVISÃO DE LITERATURA, f. 15
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SUINOCULTURA, f. 15
2.2 CIRCOVÍRUS SUÍNO, f. 16
2.2.1 *Histórico,* f. 16
2.2.2 *Classificação e Morfologia do Circovírus Suíno,* f. 18
2.2.3 *Replicação do vírus,* f. 21
2.2.4 *Evolução e variabilidade genética do vírus,* f. 22
2.2.5 *Patogenia e sinais clínicos,* f. 25
2.2.6 *Epidemiologia,* f. 27
2.2.7 *Diagnóstico,* f. 31
2.2.8 *Prevenção e controle,* f. 32
3 OBJETIVOS, f. 35
3.1 GERAL, f. 35
3.2 ESPECÍFICOS, f. 35
4 MATERIAL E MÉTODOS, f. 36
4.1 APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA, f. 36
4.2 AMOSTRAS, f. 36
4.2.1 *Critério de inclusão dos animais,* f. 39
4.2.2 *Coleta das amostras,* f. 40
4.3 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL, f. 41
4.4 IMPLEMENTAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV-2) EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS, f.41
4.4.1 *Detecção e quantificação viral do PCV-2 em amostras de soro,* f. 46
4.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR EM TEMPO REAL E *NESTED* PCR NA DETECÇÃO PCV-2, f. 46
4.6 DETECÇÃO MOLECULAR DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3), f. 47
4.7 DESENVOLVIMENTO DA *NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3) EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS, f. 49

4.7.1 *Eletroforese em Gel de Agarose*, f. 50
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS, f. 51
5 RESULTADOS, f. 52
5.1 IMPLEMENTAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV-2), f. 52
5.2 DETECÇÃO DE PCV-2 E COMPARAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL COM A *NESTED* PCR, f 54
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL DO PCV-2 E ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS ANIMAIS TESTADOS, f. 56
5.4 ESTABELECIMENTO DA *NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3), f. 58
5.5 DETECÇÃO MOLECULAR DO PCV-3 EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS, f. 60
6 DISCUSSÃO, f. 64
6.1 CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2, f. 64
6.2 CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3, f. 67
7 CONCLUSÕES, f. 72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 73
9 ANEXO, f. 94
9.1 ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais, f. 94
9.2 ANEXO 2 – Artigo submetido ao Brazilian Journal of Microbiology, f. 95
9.3 ANEXO 3 – Artigo submetido ao Transboundary and Emerging Diseases, f. 107
9.4 ANEXO 4 – Participação em eventos e publicações, f. 119
9.4.1 *Palestras proferidas*, f. 119
9.4.2 *Publicações*, f. 119

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 Detecção do Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) no Brasil, f. 17

Fig. 2 Representação da morfologia do Circovírus Suíno (PCV), f. 19

Fig. 3 Esquema gráfico do genoma do Circovírus Suíno (PCV), f. 20

Fig. 4 Representação gráfica do genoma do PCV e a localização das principais ORFs, f. 21

Fig. 5 Representação gráfica para comparação das taxas de mutação do Circovírus Suíno tipos 1, 2 e 3 (PCV-1, PCV-2 e PCV-3) em comparação a outros vírus, f. 22

Fig. 6 Árvore filogenética com os genótipos propostos para o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2), f. 23

Fig. 7 Árvore filogenética baseada na amplificação completa do gene que codifica a proteína do capsídeo com os genótipos do Circovírus Suíno 3 (PCV-3), f. 24

Fig. 8 Mapa com a distribuição geográfica do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3), f. 29

Quadro 1 Vacinas para prevenção da infecção por PCV-2, f. 33

Quadro 2 Relação dos estados, municípios e número de propriedades visitadas e número de amostras obtidas para o desenvolvimento do estudo, f. 37

Fig. 9 Mapa do estado do Rio de Janeiro com o número de municípios visitados por mesorregião, f. 38

Fig.10 Mapa do estado do Espírito Santo com a localização dos municípios visitados, f. 38

Fig.11 Animais separados para coleta de amostra de sangue, f. 39

Quadro 3 Classificação dos sinais clínicos observados nos animais no momento da coleta, f. 40

Fig.12 Coleta de amostra de sangue por punção da veia jugular externa, f. 41

Fig. 13 Fluxograma com a distribuição das amostras utilizadas para detecção e quantificação do Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2), f. 43

Quadro 4 Iniciadores, sonda e curva padrão utilizados na reação de qPCR para detecção e quantificação de PCV-2, f. 44

Fig. 14 Plasmídeo de 2.486pb com inserto de 112pb do gene que codifica a proteína de capsídeo do PCV-2, f. 44

Quadro 5 Reagentes utilizados na reação de qPCR para amplificação do gene que codifica a proteína do capsídeo do PCV-2, f. 45

Fig. 15 Fluxograma com a distribuição das amostras usadas para detecção do PCV-3, f. 47

Fig. 16 Gel de agarose evidenciando a ausência de banda de 649pb após a PCR convencional para PCV-3 com amostras de soro de suínos, f. 48

Fig. 17 Gel de agarose evidenciando a presença de banda de 649pb após a PCR convencional para PCV-3 com amostras de tecido congelado, f. 48

Quadro 6 Iniciadores utilizados nas reações de *nested* PCR para detecção do PCV-3, f. 49

Quadro 7 Reagentes utilizados nas reações de *nested* PCR para detecção do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3), f. 49

Fig. 18 Gráfico de amplificação genômica para as curvas sintéticas de PCV-2 em diluições seriadas de 3.3×10^9 até 3.3×10^2 CG/reação, f. 52

Fig. 19 Imagem gráfica demonstrando os valores de inclinação da reta (*slope)*, intercept (Y), coeficiente de regressão linear (R^2) e eficiência (Eff) para as curvas padrão sintéticas de Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2) nas diluições de 10^{-2} a 10^{-9}, f. 53

Gráfico 1 Curva ROC com os valores de sensibilidade e especificidade encontrados na comparação das técnicas moleculares usadas na detecção do PCV-2, f. 55

Gráfico 2 Representação do melhor ponto de corte em função da sensibilidade e especificidade para detecção do PCV-2, f. 55

Fig. 20 Gel de agarose evidenciando as bandas sugestivas de PCV-3 encontradas em quatro amostras usadas (RJ019, RJ031, ES309 e ES310)., f. 57

Fig. 21 Alinhamento gerado no software BLASTn entre a sequência de PCV-3 obtida nesse estudo (amostra RJ031) e demais sequências protótipos disponíveis no GenBank, f. 59

Fig. 22 Gel de agarose evidenciando o limite de detecção da *nested* PCR para PCV-3 em amostra de tecido congelado, f. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores relativos aos coeficientes de regressão linear (R^2) obtidos para os oito ensaios realizados para quantificação de DNA do PCV-2, f. 53

Tabela 2 Resultados para a detecção do PCV-2 em soro de suíno por *nested* PCR e qPCR das 149 amostras estudadas, f. 54

Tabela 3 Carga viral média, desvio-padrão e variação da carga viral do PCV-2 em relação aos sinais clínicos, f. 57

Tabela 4 Carga viral média, desvio-padrão e variação da carga viral do PCV-2 em relação às fases de produção, f. 57

Tabela 5 Resultados para a detecção do PCV-3 por estado analisado, f. 60

Tabela 6 Distribuição dos resultados gerais para PCV-3 de acordo com a fase de produção, os sinais clínicos e o sexo dos animais, f. 61

Tabela 7 Distribuição dos resultados gerais para as coinfecções encontradas de acordo com os sinais clínicos, a fase de produção e o sexo dos animais, f. 63

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, impulsionada pela tecnificação das granjas e pelo melhoramento genético dos animais, apresenta grande destaque no setor do agronegócio mundial. Segundo dados do último relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), publicado em 2018, o Brasil está entre os quatro maiores produtores e exportadores de carne suína no mundo, ficando atrás apenas de China, União Europeia e Estados Unidos da América (EUA) na produção e União Europeia, EUA e Canadá na exportação (ABPA, 2018).

Fatores como investimentos tecnológicos, biossegurança, segurança do alimento, melhoramento genético, bem-estar animal e preservação ambiental são ferramentas importantes na cadeia produtiva. Entretanto, o controle sanitário é primordial tanto para garantir a produtividade do rebanho suíno como o acesso ao comércio globalizado (SILVA *et al.*, 2011).

Apesar disso, a aplicação de diferentes inovações tecnológicas aos sistemas intensivos de produção de suínos tem gerado problemas relacionados a saúde e o bem-estar dos animais nas granjas modernas (COSTA, 2008). A suinocultura atual se caracteriza pelo aperfeiçoamento máximo da eficiência biológica dos animais, com consequente aumento das taxas de crescimento e reprodução, e pelo confinamento de grande número de animais. Estes fatores favorecem não só a perda do estado de saúde animal como também a transmissão de agentes infecciosos (MAES *et al*., 2001). Desse modo, o conhecimento das afecções que afetam a população suína é primordial nos modernos sistemas produtivos (PELLIZA *et al.*, 2007).

Nesse contexto, diferentes agentes infecciosos têm sido foco de produtores e pesquisadores desde a década de 1990, quando países produtores de suínos passaram a sofrer significativas perdas econômicas associadas a infecções por patógenos emergentes (VIDIGAL *et al*., 2012). Doenças emergentes afetam drasticamente a população animal, principalmente os animais de produção, e a intensificação da pecuária nos últimos 40 anos foi, provavelmente, um dos principais fatores para a detecção de novos vírus emergentes (KLAUMANN *et al*., 2018a).

Dentre os que merecem atenção na suinocultura estão os circovírus suíno tipos 2 (PCV-2) e 3 (PCV-3). De forma isolada ou associado a outros patógenos, o PCV-2 é responsável por grandes prejuízos econômicos em várias partes do mundo ao causar emagrecimento ou perda de peso, além de problemas respiratórios e reprodutivos (SEGALÉS, 2012). Detectado pela primeira vez em 2015, o PCV-3 causa problemas reprodutivos

(PALINSKI *et al*., 2016; PHAN *et al*., 2016), mas ainda são escassas as informações sobre a dinâmica da infecção e a distribuição desse vírus em suínos.

A prevenção contra a infecção por PCV-2 é feita através da vacinação de porcas e leitões, com vacinas inativadas disponíveis no mercado desde o final do ano 2000 (CASTRO *et al.,* 2007; CHARREYRE *et al.,* 2006), mas ainda não existe no mercado vacina contra o PCV-3.

A suinocultura brasileira é uma atividade de importante cunho social e econômico por envolver um número considerável de pequenos produtores e empregados em toda a sua cadeia produtiva, garantindo o abastecimento do mercado interno e gerando divisas através das exportações (GUIMARÃES *et al*., 2017). Mesmo não sendo atualmente um estado relevante na suinocultura, em 2013 o estado do Rio de Janeiro (RJ) apresentava um rebanho de 44.224 suínos, 374 produtores ativos e uma produção de carne suína de 3.077,30 toneladas (MORAES, 2014). Em 2017, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), esse rebanho era de 73.570 animais (IBGE, 2018), apresentando um aumento significativo de 66,35% em relação ao período de 2013. Já o estado do Espírito Santo (ES), em 2017, apresentava um rebanho formado por 26.408 matrizes (ABPA, 2018). Esses dados demonstram o potencial econômico que a atividade apresenta para os estados e a importância de conhecermos a circulação de agentes infecciosos no rebanho de suínos.

O PCV-2 foi detectado pela primeira vez no RJ em 2002 (FRANÇA *et al.*, 2005) e, em 2016, um artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o vírus circula em todas as mesorregiões do estado (CRUZ *et al.,* 2016). Em relação ao ES, trabalhos publicados em 2006 e 2010 relatam a presença do PCV-2 no estado (CHIARELLI-NETO *et al.,* 2006; ROCHA *et al.,* 2010).

No Brasil, até o momento, apenas dois artigos relatam a presença do PCV-3 no rebanho brasileiro (SARAIVA *et al.,* 2019; TOCHETTO *et al*., 2018), mas apenas o último identificou o vírus no ES. Não existem relatos da presença do PCV-3 no RJ, o que determina a importância do nosso estudo para os dois estados.

A detecção molecular baseada na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) permite o diagnóstico do PCV-2 e do PCV-3 de forma rápida e sensível a partir de uma variedade de amostras, tais como soro, sangue, tecidos, sêmen, secreções nasais, fezes e tecidos fixados em formol (CRUZ *et al*., 2016; KARUPPANNAN e OPRIESSNIG, 2017; KLAUMANN *et al*., 2018a; LI *et al*., 2018b; SEGALÉS, 2012; SHIBATA *et al.,* 2003).

Por serem considerados vírus emergentes e que afetam sobremaneira a suinocultura, a coleta de dados sobre sua epidemiologia e circulação contribuirá para o avanço no

conhecimento desses agentes no Brasil, principalmente para os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, onde a suinocultura apresenta grande potencial produtor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SUINOCULTURA

Dados publicados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) mostram que, em 2018, o Brasil produziu 3.97 milhões de toneladas de carne suína, um aumento de 5,75% em relação ao ano anterior, ocupando o 4º lugar como maior produtor de carne no mundo (EMBRAPA, 2018). Em relação ao Espírito Santo, o mesmo relatório mostra que o estado produziu, em 2018, 26 mil toneladas de carne suína, ocupando o 9º lugar no ranking dos maiores produtores brasileiros de carne suína (EMBRAPA, 2018).

Em relação à exportação da carne suína, o país vem ocupando a 4ª posição nos últimos 19 anos tendo exportado, em 2018, 646 mil toneladas (EMBRAPA, 2018), o que gerou uma receita de US$ 1,070 bilhão (MDIC, 2019). De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (ABCS), o Brasil exportou, apenas no primeiro semestre de 2019, 346,6 mil toneladas de carne suína, gerando uma receita de US$ 699,7 milhões, número 23,4% maior que o registrado no mesmo período de 2018. As perspectivas apontam que a produção de suínos no país em 2019 será 6% maior em relação a 2018 e que as exportações também aumentarão, podendo chegar a 900 mil toneladas (ABCS, 2019). De acordo com a ABPA, a maior produção de carne suína do país está concentrada na Região Sul, que corresponde a 68,92% do abate nacional de suínos, seguida pelas Regiões Sudeste (16,03%), Centro-Oeste (14,93%), Norte (0,10%) e Nordeste (0,03%) (ABPA, 2018). O Espírito Santo exportou, em 2017, 278 toneladas de carne suína, movimentando R$ 150 milhões e gerando 4.000 empregos diretos (ASES, 2018). Não foram encontradas informações a respeito da produção de carne suína no estado do Rio de Janeiro, mas, de acordo com relatório da Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, de janeiro a agosto de 2014 o estado exportou o equivalente, em cortes de carne suína, a US$ 1 milhão (ABIPECS, 2014).

Em 2018, 40,2% da proteína animal consumida no mundo era de origem suína, o que corresponde a 120 milhões de toneladas de carne (STATISTA, 2018). Nesse mesmo ano, o consumo médio de carne suína no Brasil foi de 15,6 kg de carne per capita, ocupando o país a 24ª no ranking do consumo (STATISTA, 2018).

2.2 CIRCOVÍRUS SUÍNO

2.2.1 *Histórico*

O circovírus suíno (do inglês *Porcine Circovirus* - PCV) foi descrito na década de 1970 na Alemanha como contaminante da linhagem celular de rim suíno PK-15 (TISCHER *et al.*, 1974). Em 1982, este vírus teve seu material genético descrito como DNA, fita única, circular e covalentemente ligada nas suas extremidades (TISCHER *et al.*, 1982).

Embora testes sorológicos revelassem a presença de anticorpos de PCV na população suína da época, até a década de 1990 nenhuma enfermidade havia sido associada ao mesmo (ALLAN *et al.,* 1994; TISCHER *et al.*,1986). Em 1991, uma nova doença denominada Síndrome da Refugagem Multissistêmica dos suínos (do inglês *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* - PMWS) foi descrita no Canadá. Os animais acometidos apresentavam perda progressiva de peso, doença respiratória e pele pálida (CLARK, 1997; HARDING, 1996). Um ano depois, o PCV foi detectado em amostras clínicas de animais com essa síndrome e foi associado à mesma (CLARK, 1997).

Em 1996, o genoma do PCV associado à PMWS foi totalmente sequenciado, sendo descritas importantes diferenças genômicas entre este e o PCV associado à linhagem celular PK-15, como menos de 80% de identidade de nucleotídeos entre eles (ALLAN *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1998). Assim, sugeriu-se renomear os dois vírus como PCV tipo 1 (PCV-1) e tipo 2 (PCV-2) (ALLAN *et al.*, 1999). Enquanto o PCV-1, associado à linhagem celular, é considerado não patogênico, o PCV-2 está implicado como principal agente etiológico das Doenças Suínas Associadas ao Circovírus Suíno (do inglês *Porcine Circovirus Associated Diseases* - PCVAD) (ALLAN *et al.*, 1998; CLARK, 1997; HARDING *et al.*, 1998; OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

Dados epidemiológicos indicam que o PCV-2 circula na população de suínos há mais de 50 anos, antes mesmo de sua associação com doenças (ALLAN *et al.*, 2007; SEGALÉS *et al.*, 2013 (JACOBSEN *et al*., 2009; RODRIGUES, 2019). No Brasil, o PCV-2 foi identificado pela primeira vez em 2000 no estado de Santa Catarina por Ciacci-Zanella e Morés (2001). Desde então, o vírus já foi detectado em vários estados, incluindo Rio de Janeiro e Espírito Santo (Figura 1).

O primeiro relato da presença do PCV-2 no estado do Rio de Janeiro data de 2002, quando 14 animais de uma mesma propriedade foram a óbito por causas desconhecidas em um período de seis meses. Esse fato atraiu a atenção de França et al. (2005) que, por diferentes técnicas diagnósticas, inclusive moleculares, identificaram o PCV-2 como agente responsável pelos mesmos. Em 2016, Cruz et al. demonstraram a circulação desse vírus nas

seis mesorregiões do estado (CRUZ *et al.*, 2016). Em 2006, foi publicado o primeiro trabalho relatando a presença do PCV-2 no estado do Espírito Santo (CHIARELLI-NETO *et al*., 2006) e, até 2018 apenas dois trabalhos relataram a presença desse vírus no estado (CHIARELLI-NETO *et al*., 2006; ROCHA *et al*., 2010). Em 2018 o PCV-2 foi detectado por Souza em tecidos de suínos de matadouro do Espírito Santo (SOUZA, 2018).

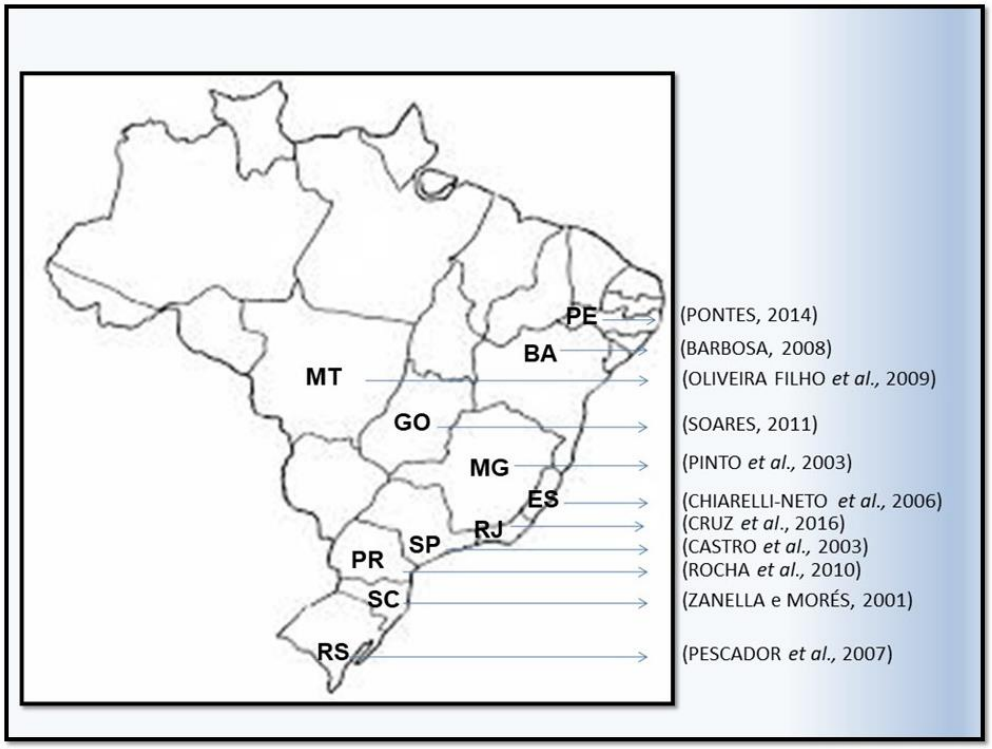


Figura 1 - Detecção do Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) no Brasil**.** Mapa elaborado pela autora com base nos artigos publicados.

Em 2015, um terceiro vírus do gênero *Circovirus* foi detectado, pela primeira vez, nos Estados Unidos (PALINSKI *et al.*, 2016; PHAN *et al.*, 2016). Na Carolina do Norte, foi registrado um aumento da taxa de mortalidade de porcas com sinais clínicos consistentes com Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS). Nessa mesma propriedade, fêmeas apresentavam uma taxa de parição abaixo da média e houve aumento no número de fetos abortados com sinais clínicos similares à essa síndrome. Apesar das lesões histológicas encontradas nos animais serem consistentes com a PDNS, os tecidos coletados das porcas e dos fetos foram testados por imunohistoquímica (IHQ) e PCR em tempo real (qPCR) apresentando resultados negativos para PCV-2, para o vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRSV) e Vírus da Influenza A. Para identificar o agente envolvido nas lesões, foi realizado uma análise metagenômica e um sequenciamento de nova geração,

que revelou a presença de um novo circovírus, geneticamente divergente do PCV-2, designado circovírus suíno tipo 3 (PCV-3) (PALINSKI *et al.*, 2016).

Ao mesmo tempo, em uma propriedade do Missouri, EUA, outro grupo de pesquisa descreveu um quadro clínico patologicamente caracterizado como miocardite e inflamação multissistêmica, sem etiologia conhecida, presente em animais com anorexia e perda de peso (PHAN *et al.,* 2016). Para identificar o agente causador das lesões, o grupo realizou um sequenciamento genômico a partir de tecidos cardíacos de três animais doentes, nos quais foi identificado um circovírus com 2000 nucleotídeos e menos de 50% de identidade com os vírus da família *Circoviridae* previamente descritos, que então foi classificado como circovírus suíno tipo 3 (PCV-3) (PHAN *et al*., 2016). O PCV-3 é o segundo membro do gênero *Circovirus* a causar doença em suínos (KLAUMANN *et al*., 2018a).

O PCV-3 foi descrito no Brasil pela primeira vez em 2018 (TOCHETTO *et al,* 2018), e no Espírito Santo em 2019 (SARAIVA *et al.,* 2019). Ainda não existem relatos da presença do PCV-3 nos suínos do estado do Rio de Janeiro.

2.2.2 *Classificação e Morfologia do Circovírus Suíno*

O circovírus suíno foi inicialmente descrito como morfologicamente semelhante às partículas de um picornavírus por microscopia eletrônica (Figura 2) (TISCHER *et al.,* 1974). O nome circovírus suíno (PCV) foi proposto por Tischer et al. (1982) devido ao genoma circular, sendo classificado no gênero *Circovirus*, família *Circoviridae* em 1995 (ICTV, 1995).

A partícula viral dos PCV mede de 16 a 18 nanômetros, não apresenta envelope e tem capsídeo icosaédrico formado por 60 subunidades proteicas (Figura 2). As proteínas de capsídeo dos PCV-1 e 2 tem peso molecular de 30 kDa (FINSTERBUSC e MANKERTZ, 2009; NAWAGITGUL *et al.,* 2000), enquanto a do PCV-3 tem peso aproximado de 26 kDa (ZHANG *et al*., 2019).

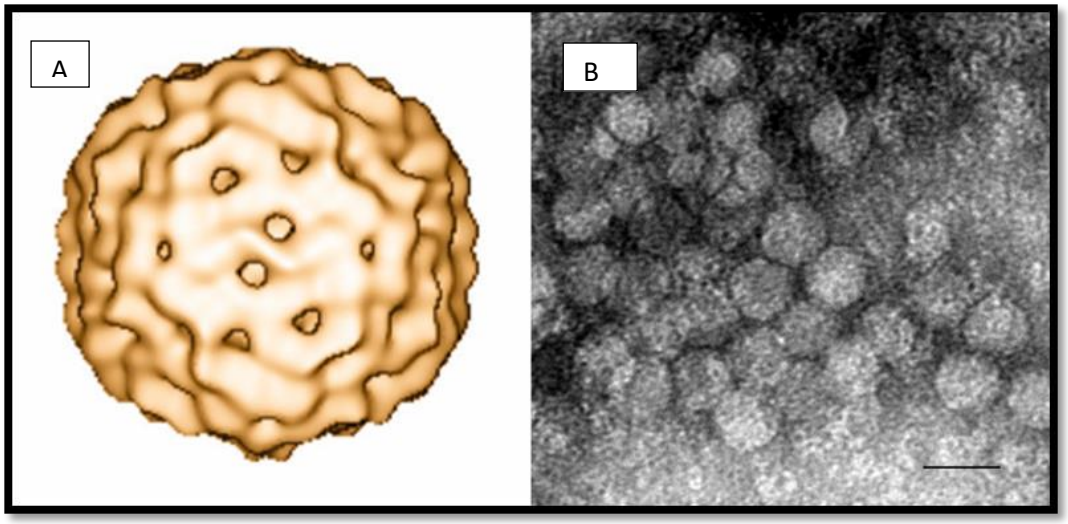


Figura 2 – Representação da morfologia do Circovírus Suíno (PCV). (A) Reconstrução em 3D do PCV-2. (B) Micrografia eletrônica do PCV-2. Fonte: ICTV, 2019

O PCV contém um genoma de DNA fita simples circular ligado covalentemente em suas extremidades e tem de 1759 a 2000 nucleotídeos. Este é um dos menores vírus DNA que apresenta genoma não segmentado descrito (FINSTERBUSCH e MANKERTZ, 2009; HAMEL *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2012).

O genoma do PCV, apresenta sentido ambissenso, formando duas regiões intergênicas, uma mais curta entre as extremidades 3’ dos genes *rep* e *cap*, e outra mais longa entre suas extremidades 5’, essa última sendo a origem da replicação (*ori*) do genoma viral (FINSTERBUSCH e MANKERTZ, 2009). A região 5´ apresenta uma estrutura conservada em forma de grampo, a “stem-loop” (Figura 3), que contém uma sequência repetida de nove bases (TAGTATTAC) dentro da origem de replicação (ori) importante para a ligação da replicase viral (FINSTERBUSCH e MANKERTZ, 2009; STEINFELDT *et al.*, 2001).

O PCV é um dos mais simples entre os vírus, necessitando apenas de uma proteína do capsídeo e duas proteínas replicase para sua replicação e produção de uma partícula viral infecciosa (FAUREZ *et al.*, 2009). Três principais Fases de Leitura Aberta (do inglês *Open Reading Frame* - ORFs) são encontradas no circovírus. A ORF1, no sentido positivo, codifica a proteína replicase (Rep) essencial para a replicação do DNA viral, com tamanho de 312 aminoácidos (aa) para o PCV-2 e 297 aa para o PCV-3. A ORF2, no sentido negativo, codifica a Cap, proteína do capsídeo viral e maior proteína imunogênica do PCV-2 e com tamanho de 214 aa no PCV-3 (PALINSKI *et al.*, 2016). A proteína codificada pela ORF3, que também está no sentido positivo do genoma, apresenta importante participação na indução da

apoptose (HU *et al*., 2013; LIU *et al.*, 2007), sendo fundamental no desenvolvimento da patogênese do PCV-2 (CHIARELLI-NETO *et al.*, 2009).

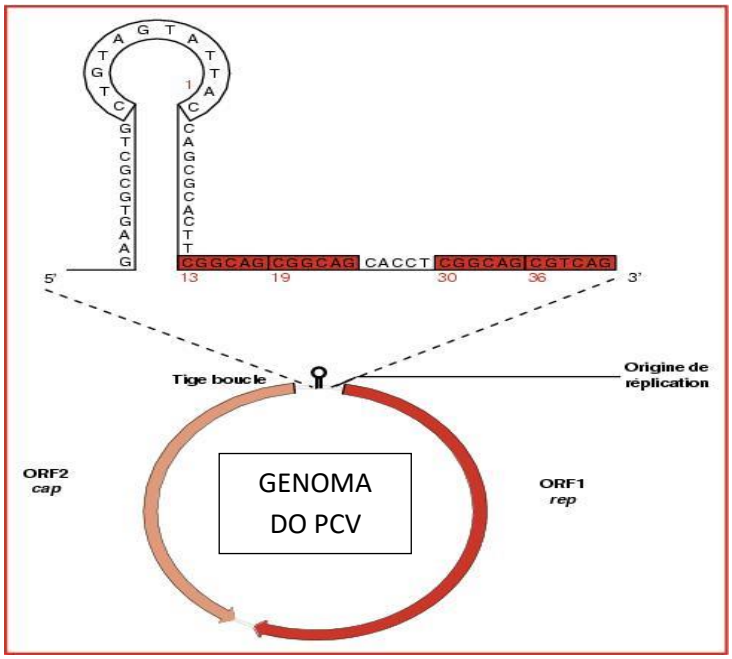


Figura 3 – Esquema gráfico do genoma do Circovírus Suíno (PCV). Fonte: Faurez et al., 2009.

A função da proteína codificada pela ORF3 no PCV-3 ainda não está esclarecida (PALINSKI *et al.*, 2016; PHAN *et al.*, 2016), mas até o momento foi descrito que, dependendo da posição do códon de iniciação, são codificadas duas proteínas com tamanhos diferentes, 177 e 231 aa (FUX *et al.*, 2018). O tamanho das ORFs varia entre as espécies de circovírus suíno (Figura 4) (OUYANG *et al.*, 2019a). Além das três principais ORFs descritas para o PCV-2, outras duas ORFs, ORF4 e ORF5, já tiveram suas funções descritas. A ORF4 desempenha um importante papel na restrição da ORF3, prevenindo a apoptose da célula. Além disso, ela inibe a replicação viral nos estágios iniciais da infecção (GAO *et al.*, 2014). A ORF5 codifica uma proteína que inibe a expressão de interferon tipo I, aumentando, assim, a replicação do PCV-2 nas células epiteliais dos suínos. A função das proteínas codificadas pelas outras sete ORFs identificadas (6 a 12) ainda não está esclarecida (CHOI *et al*., 2018; GAO *et al*., 2014; OUYANG *et al.*, 2019a).

Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, a identidade de aminoácidos entre os circovírus suínos descritos até o momento é de 31% entre o PCV-3 e o PCV-1, e de 48% entre o PCV-3 e o PCV-2 (PALINSKI *et al*., 2016; PHAN *et al*., 2016; OUYANG *et al*., 2019b).

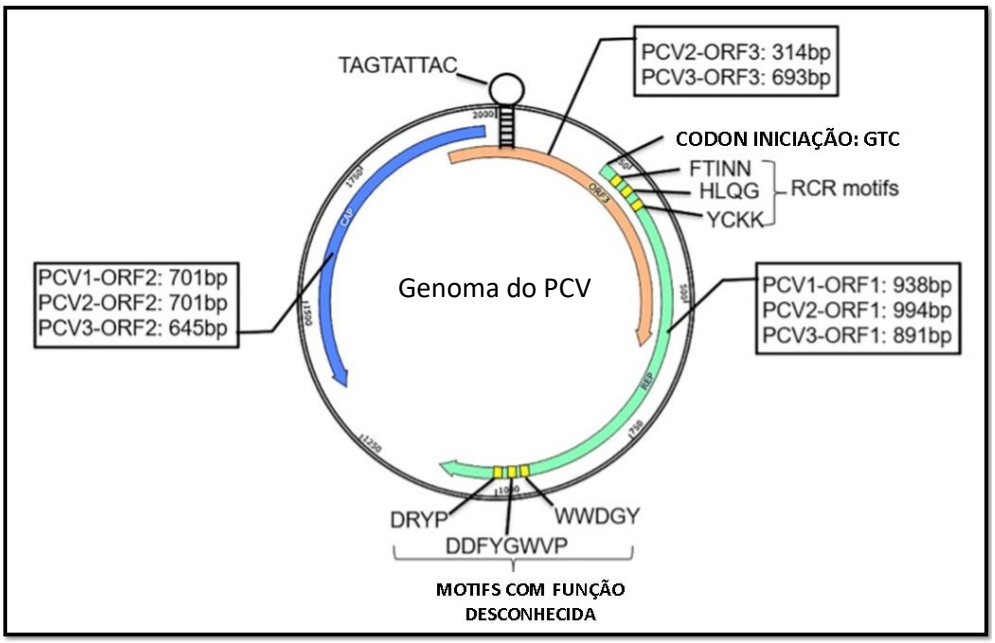


Figura 4 – Representação gráfica do genoma do PCV e a localização das principais ORFs. Fonte: Ouyang et al., 2019a.

2.2 3 *Replicação do vírus*

Os circovírus são os menores vírus capazes de replicação em células de mamíferos e, devido à sua simplicidade genômica e estrutural, sua biossíntese requer a participação de várias enzimas das células hospedeiras e ocorre durante a fase S do ciclo celular (CIACCI-ZANELLA, 2007). Eles têm tropismo por vários tipos celulares, principalmente células epiteliais e endoteliais, assim como macrófagos. Entretanto, devido à sua baixa atividade mitótica, o número de macrófagos que apresentam evidência de replicação é baixo (HAMBERG *et al.*, 2007; PÉREZ-MARTÍN *et al.*, 2007).

A entrada do PCV na célula ocorre por endocitose clatrina-dependente e necessita da acidificação do endossomo para a infecção (MISINZO *et al.*, 2005). Após a penetração do PCV-2 na célula, ocorre a síntese de uma molécula DNA de fita dupla, também conhecida como replicativo intermediário (RF), no núcleo da mesma (HAMEL *et al.*, 1998). O RF é ambissenso e apresenta genes que são codificados tanto pela fita positiva como pela negativa (complementar) (CHEUNG, 2012).

A proteína Rep é a responsável pela clivagem do DNA viral formando um terminal 3’-OH livre para o início da replicação (TISCHER *et al.*, 1987). A transcrição do gene *cap* origina um pré-RNA, também denominado transcrito imediato, o qual sofre um processo de

"splicing" (remoção do íntron) gerando um RNA mensageiro (mRNA) maduro com uma fase aberta de leitura continuada (CHEUNG, 2003) que contém três ORFs que são traduzidas em três proteínas. Com a replicação da fita dupla de DNA ocorre a produção de cópias do DNA genômico que são, então, encapsuladas pela proteína Cap (CHEUNG, 2012).

2.2.4 *Evolução e variabilidade genética do vírus*

Estudos sugerem que PCV-1 e PCV-2 têm origem evolutiva comum (OLVERA *et al.*, 2007). Estima-se que as espécies surgiram de um ancestral comum há aproximadamente 100 anos e que seguiram trajetórias evolutivas independentes desde então (FIRTH *et al.*, 2009). Já para o PCV-3, foi sugerido um ancestral de 1.372 anos atrás (FRANZO *et al.*, 2019).

A taxa evolutiva estimada para PCV-1 é de $1.15x10^{-5}$ substituições de nucleotídeos/sítio/ano (CORTEY e SEGALÉS, 2012). Para o PCV-2, a taxa evolutiva observada para o genoma completo é de $1.20x10^{-3}$ substituições ano (FIRTH *et al.*, 2009), duas ordens de grandeza maior que a taxa observada para PCV-1 (CORTEY e SEGALÉS, 2012), e superior ao observado em outros vírus DNA, podendo ser comparada ao observado em alguns vírus RNA (TRIBLE e ROWLAND, 2012). Para o PCV-3 a taxa evolutiva estimada por Franzo et al. (2019), quando observado o genoma completo, é de 2.35×10^{-5}, mais próxima do PCV-1 (Figura 5).

Em função dessa alta taxa de mutação, suspeita-se que o PCV-2 apresente *quasispecies* (FIRTH *et al.*, 2009). No entanto, análises extensivas de sequenciamento seriam necessárias para confirmar esta hipótese (SEGALÉS *et al.*, 2013).

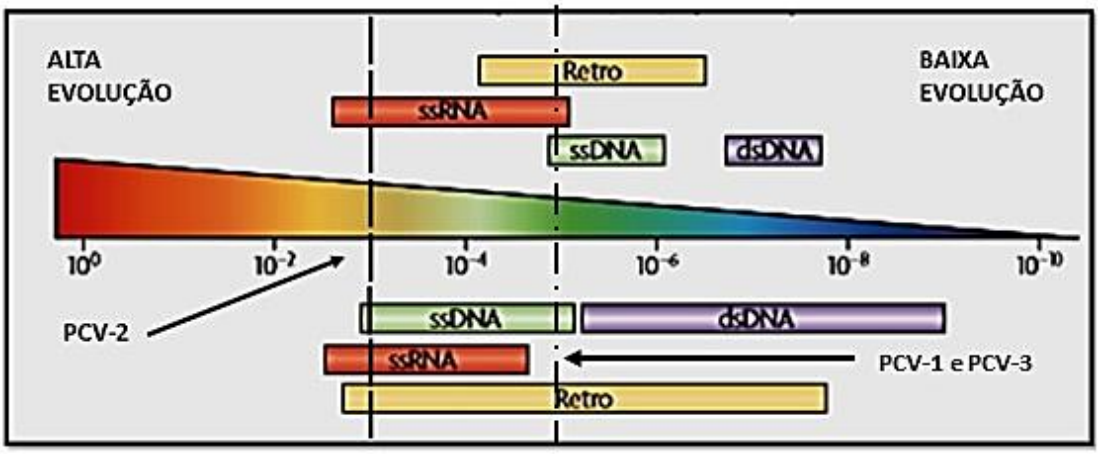


Figura 5 - Representação gráfica para comparação das taxas de mutação do Circovírus Suíno tipos 1, 2 e 3 (PCV-1, PCV-2 e PCV-3) em comparação a outros vírus de genoma DNA e RNA com baixas e altas taxas de evolução. Adaptado de Duffy et al., 2008.

De acordo com metodologia proposta em 2008 (GRAU-ROMA *et al.,* 2008; SEGALÉS *et al.*, 2008) e aceita por pesquisadores da Europa e das Américas, a Análise de Comparação de Sequência em Pares (do inglês *Pairwise Sequence Comparisons Analysis* - PASC) deve ser aplicada na região do genoma que codifica a proteína de capsídeo (região 1487 a 1472 nucleotídeos) e um valor de divergência nucleotídica de 0.035 é definido como limite para a diferenciação dos genótipos do PCV-2 (CORTEY *et al*., 2011a). Através do método proposto, sequências com valores de divergência superiores ao ponto de corte pertenceriam a diferentes genótipos (SEGALÉS *et al*., 2008). Por esse método, seis genótipos de PCV-2 foram descritos até o momento (BAO *et al*., 2018). Entretanto, reconhecendo a dificuldade de definir um ponto de corte claro entre os genótipos, Franzo e Segalés propuseram, em 2018, uma nova definição dos genótipos. Com base em três critérios: distância máxima de 13% intra-genótipos (calculada na ORF2), "bootstrap" no nó interno superior a 70%, e pelo menos 15 sequências disponíveis, foram definidos oito genótipos (Figura 6) (FRANZO E SEGALÉS, 2018).

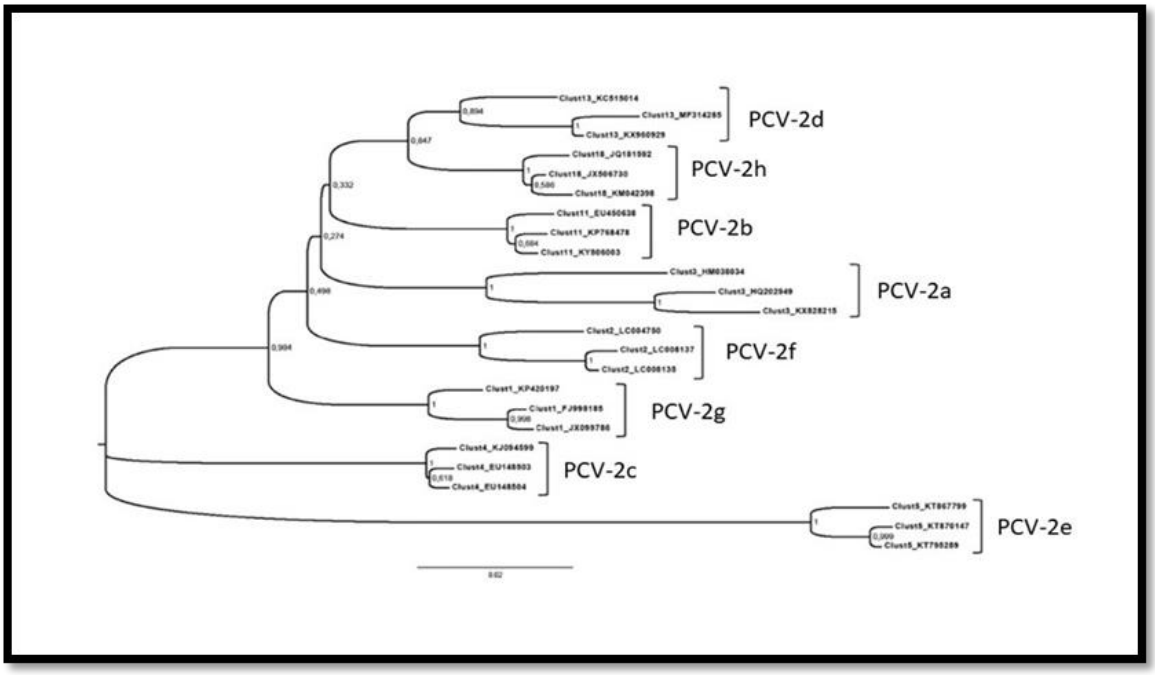


Figura 6 – Árvore filogenética com os genótipos propostos para o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2). Fonte: Franzo e Segalés, 2018.

Análises filogenéticas do PCV-3, baseadas no genoma completo do vírus, apontam uma tendência das sequências obtidas se alinharem formando dois genótipos, classificados como PCV-3a e PCV-3b (FRANZO *et al*., 2017; FUX *et al*., 2018; KU *et al*., 2017).

Baseados nessa análise, estes autores sugerem que o PCV-3 entrou na Europa por vários locais diferentes, o que explicaria a heterogeneidade encontrada entre as diversas sequências analisadas. Já a análise das mutações A24V e R27K na proteína do capsídeo, dividem o PCV-3 em três genótipos PCV-3a, PCV-3b e PCV-3c, e três sub-genótipos (PCV-3a1, PCV-3a2 e PCV-3a3 (Figura 7) (FU *et al*., 2018).

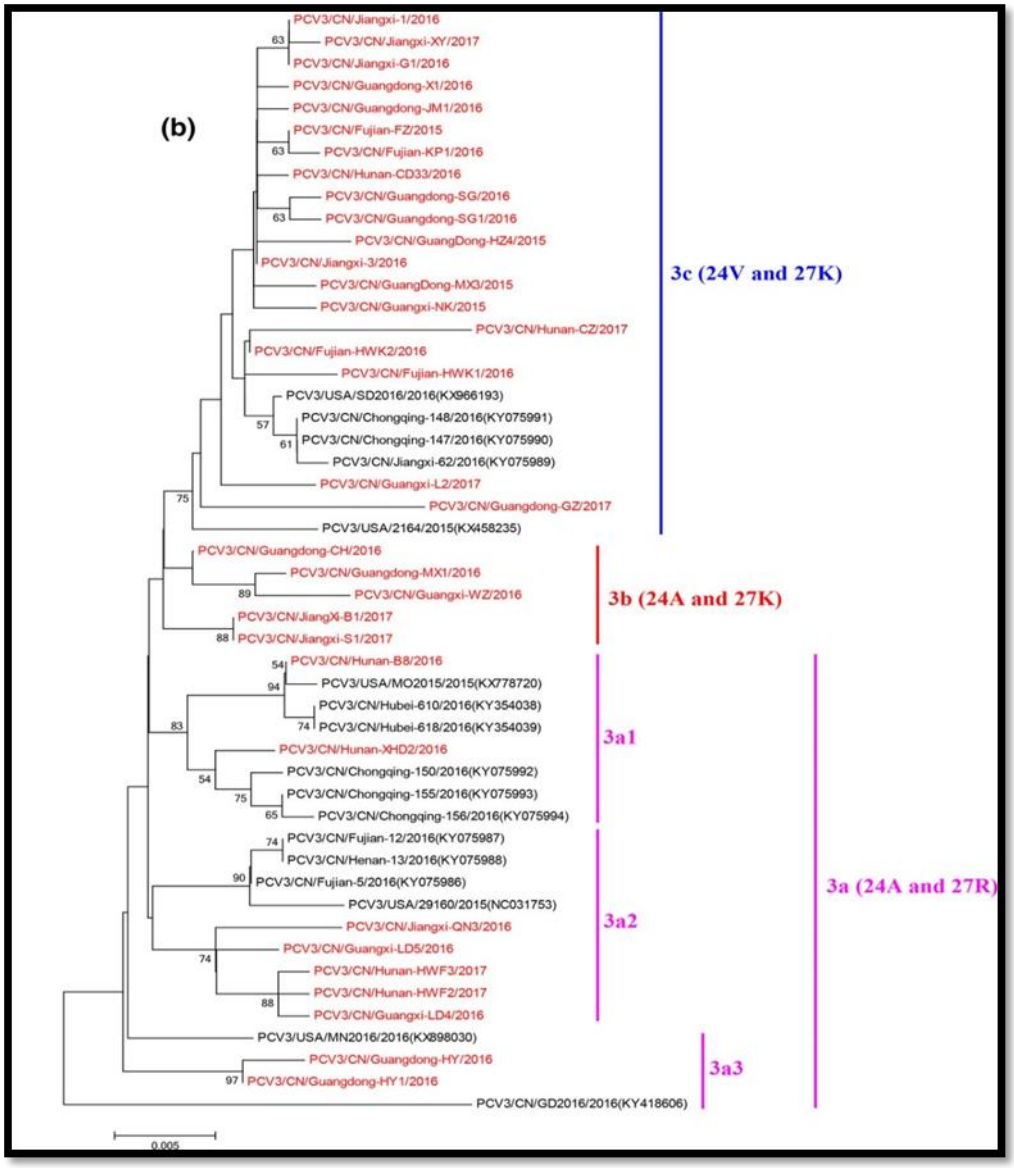


Figura 7 - Árvore filogenética baseada na amplificação completa do gene que codifica a proteína do capsídeo com os genótipos do Circovírus Suíno 3 (PCV-3). Fonte: Fu et al., 2018.

2.2.5 *Patogenia e sinais clínicos*

A infecção por PCV-2 é clinicamente manifestada pela síndrome de perda multissistêmica pós-desmame (PWMS), doença respiratória e entérica, falha reprodutiva e síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos (PDNS) (OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

O PCV-2 também já foi relacionado à doença do complexo respiratório suíno (PRDC), que se caracteriza por causar um crescimento lento e irregular, redução no consumo alimentar, aumento da conversão alimentar, tosse e pneumonia, acometendo leitões entre 16 e 20 semanas de idade, em associação com os principais patógenos envolvidos no desenvolvimento do complexo, como o PRRSV (Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína), o Vírus da Influenza e o *Mycoplasma hyopneumoniae* (HARMS *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2007; SEGALÉS *et al.*, 2013). Na maioria dos casos, dificilmente distinguem-se doenças do complexo respiratório suíno e circovirose, uma vez que ambos são clinicamente muito semelhantes (CASTRO *et al.*, 2007; SEGALÉS *et al*., 2013).

A interação entre o PCV-2 e seu hospedeiro natural, o suíno, é um processo complexo, que tem início com a entrada do vírus nas células (NAUWYNCK *et al.*, 2012). Essa interação pode produzir uma resposta imune adaptativa que não permite a expressão da infecção por parte do animal, embora possa estabelecer uma viremia persistente (SEGALÉS, 2012).

Atualmente, a forma mais comum de infecção por PCV-2 é a subclínica (PCV2-SI), onde, apesar dos sinais clínicos não serem observados, os animais apresentam retardo no ganho de peso ou emagrecimento (OLIVER-FERRANDO *et al*., 2016; SEGALÉS, 2012). De acordo com Oliver-Ferrando et al. (2016), a infecção subclínica pode estar associada a um protocolo inadequado de vacinação contra PCV-2, mas a causa certa dessa forma de infecção ainda precisa ser mais pesquisada.

Uma questão fundamental na patogenia do PCV-2 é a forma como o indivíduo responde à infecção: em uma mesma baia, alguns animais exibem sinais clínicos enquanto outros desenvolvem uma infecção assintomática (SEGALÉS e DOMINGO, 2002; SEGALÉS *et al.*, 2013). Dessa forma, a questão é: por que um animal desenvolve a doença e outro não? Baseado em dados publicados por Segalés et al. (2013), o desenvolvimento da doença parece ser o resultado do "*porco certo infectado no momento certo pelo vírus certo*". Isso pode ser traduzido como: deficiência da resposta imune do hospedeiro, tempo de infecção (declínio dos anticorpos maternos, infecção precoce pelo vírus e coinfecções) e genótipos do PCV-2.

Em condições naturais, leitões entre três e quatro semanas de idade apresentam a soroconversão com mais frequência e anticorpos podem ser detectados em suínos nas diferentes fases de criação (ALLAN e ELLIS, 2000). A viremia ocorre entre as 7ª e as 16ª semanas de idade. Entretanto, a variação individual na detecção do DNA do PCV-2 pode ser de 5 a 21 semanas, demonstrando que alguns suínos podem desenvolver uma viremia persistente (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Em animais com anticorpos maternos elevados a viremia é baixa, aumentando conforme o nível dos anticorpos diminui (GRAU-ROMA *et al.*, 2011).

A transmissão vertical pode ser confirmada através da presença do vírus em amostras de sêmen e colostro (SHEN *et al.*, 2010), e em isolados de fetos abortados no final da gestação e de natimortos oriundos de granjas com problemas reprodutivos. Inoculações experimentais demonstraram que o vírus tem capacidade de replicação e causa anormalidades nos fetos em diferentes fases da gestação (ALLAN *et al.*, 1995; LYOO *et al.*, 2001).

A presença do PCV-2 é essencial, mas não suficiente para causar a circovirose, que é considerada uma síndrome multifatorial onde a presença de outros agentes como Parvovírus suíno, Torque teno suíno, Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos e *Mycoplasma hyopneumoniae*, é muito importante (CASTRO *et al.*, 2007; CRUZ *et al*., 2016; KEKARAINEN *et al.*, 2007). Essas coinfecções alteram e/ou intensificam os sinais clínicos apresentados pelos animais, dificultando a identificação da doença (CASTRO *et al.*, 2007), podendo aumentar a replicação do PCV-2 ou interferirem com a expressão do sistema imune do hospedeiro, alterando a produção de citocinas e a proliferação celular, favorecendo a replicação viral (OPRIESSNIG e HALBUR, 2012).

A patogenicidade do PCV-3 ainda não está totalmente esclarecida, mas o vírus já foi detectado em animais com sinais clínicos de dermatite e nefropatia e problemas reprodutivos, e apresentando lesões como vasculite, glomerulonefrite, pneumonia intersticial, miocardite supurativa e arteriolite (PALINSKI *et al.*, 2016; PHAN *et al.*, 2016). Mais recentemente, Jiang et al. (2019) encontraram linfadenite granulomatosa e vasculite em tecido hepático de animais infectados experimentalmente com PCV-3, demonstrando que o vírus pode causar lesão em vários órgãos. Essa teoria é corroborada por outros trabalhos desenvolvidos pelo mesmo grupo, que demonstraram a presença de antígenos do PCV-3 em pulmões, coração, rins, linfonodos, baço, fígado e intestino delgado de animais infectados (FRANZO *et al*., 2018a; LI *et al*., 2018a). Mesmo com essas novas informações, o caminho da infecção por PCV-3 ainda é desconhecido, especialmente em função da dificuldade na propagação e isolamento do vírus em cultura de células (LI *et al.*, 2018a).

Não existem evidências de infecção persistente por PCV-3 em suínos domésticos e, até o momento, não foram publicados estudos longitudinais sobre essas infecções.

2.2.6 *Epidemiologia*

No início dos anos 1990, a PMWS surgiu como uma doença cujas características eram emagrecimento, perda do ganho de peso diário e alta mortalidade, afetando principalmente suínos com idade entre cinco e 12 semanas de vida (ALLAN e ELLIS, 2000; HARDING e CLARK, 1997). Além disso, a doença causava um aumento no custo da produção não somente pela mortalidade e perda de peso, mas também devido ao uso de medicamentos para combater infecções secundárias e o aumento no número de animais descartados (ALARCON *et al.*, 2013).

Existem evidências da presença do PCV-2 na população suína há décadas, antes mesmo da descrição das manifestações clínicas no início dos anos 90 (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2006; JACOBSEN *et al.*, 2009; SEGALÉS *et al.*, 2013). A detecção de PCV-2 foi descrita em suínos com e sem sinais clínicos de PMWS em todos os continentes (ALLAN e ELLIS, 2000). Na América do Sul, o PCV-2 já foi detectado no Brasil, Argentina, Chile, Colômbia e Uruguai (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2001; CRUZ *et al.*, 2016; MONROY *et al.*, 2014; PEREDA *et al.*, 2011; RAMOS *et al*., 2012; RUIZ *et al.*, 2007; SARRADELL *et al.*, 2002). A prevalência de PCV-2 nos rebanhos mundiais tem sido confirmada com o uso de PCR (Reação em cadeia pela polimerase) em amostras de soro, sangue, sêmen, secreções nasais, amostras ambientais e tecidos fixados em formol (CRUZ *et al*., 2016; GERBER *et al.*, 2010; LÓPEZ-LORENZO *et al.*, 2019; MORANDI *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2011; SEGALÉS, 2012).

A presença de PCV-2 em amostras nasal, tonsilar, brônquica, urinária, fecal e de sêmen de animais com e sem sinais clínicos de circovirose sugere que a via de transmissão horizontal é a mais comum (SEGALÉS *et al.*, 2005), mas talvez não a mais eficiente. Andraud et al. (2008), colocando em uma mesma baia animais infectados e não infectados com PCV-2, verificou que a viremia nos animais não infectados só foi detectada 35 dias após o contato, sugerindo que a infecção através de contato direto entre animais é baixa.

A disseminação do PCV-2, causando epidemias em várias partes do mundo, está diretamente relacionada ao comércio global de suínos vivos, sêmen e produtos suínos, principalmente ao comércio de animais com infecção subclínica, devido à natureza sutil da

doença, que invariavelmente exige uma verificação diagnóstica mais crítica sobre os animais importados ou seus produtos (FRANZO *et al*., 2015b; VIDIGAL *et al*., 2012).

Os genótipos 2a e 2b foram os mais encontrados em vários países do mundo, enquanto o 2c foi encontrado apenas em amostras de soro de suínos arquivadas na Dinamarca e de porco selvagem no Brasil (CHEUNG *et al.,* 2007; DUPONT *et al.*, 2008; FRANZO *et al*., 2015a; OLVERA *et al.,* 2007; SEGALÉS *et al.*,2008).

O PCV-2e foi identificado pela primeira vez em 2006 em amostras de animais do México e dos EUA (DAVIES *et al.,* 2016; HARMON *et al*., 2015). Em um recente estudo realizado na China por Bao et al. (2018), o genótipo PCV-2f foi descrito a partir de novas sequências virais, formando grupos distintos dos genótipos já existentes. A significância clínica destes genótipos ainda não está esclarecida.

Segundo Franzo et al. (2016), a dinâmica populacional do PCV-2 foi caracterizada pelo aparecimento de ondas periódicas de genótipos distintos, 2a e 2b, que após um aumento inicial, se espalharam seguindo rotas comerciais suínas principais e foram então substituídas por genótipos emergentes subsequentes, 2d-2f.

A análise Bayesiana da região de capsídeo de amostras de PCV-2 identificadas no estado do Rio de Janeiro evidenciou a formação de dois *clusters* distintos, o primeiro com as amostras pertencentes ao genótipo 2a e protótipos 2a e 2e, e um segundo *cluster* com as amostras 2b e 2d. Cinco amostras 2b formaram um *subcluster* com sete protótipos 2b (CRUZ *et al*., 2016)

Duas mudanças genotípicas ocorreram com o PCV-2 no século 20. Em 2005 o PCV-2a foi substituído pelo PCV-2b, e em 2008 o PCV-2b foi substituído pelo PCV-2d (FRANZO *et al.,* 2016; KARUPPNNAN & OPRIESSNIG, 2017; REINER *et al.,* 2015; XIAO *et al.,* 2015). Sabe-se que, atualmente, o PCV-2d é o genótipo mais prevalente no mundo (KARUPPNNAN & OPRIESSNIG, 2017; TSAI *et al.,* 2019; THANGTHAMNIYOM *et al*., 2017; XIAO *et al.,* 2016; WANG *et al.,* 2009). Embora dados epidemiológicos não demonstrem a associação dos genótipos aos surtos epidêmicos acontecidos, estudos publicados em diferentes países descrevem uma alteração de genótipos (2a para 2b) acontecendo ao mesmo tempo da maioria dos surtos de circovirose (CHEUNG *et al*., 2007; CORTEY *et al*., 2011b; TIMMUSK *et al*., 2008). Tal coincidência no tempo e no espaço ressalta que essa alteração de genótipos é mais uma parte do quebra-cabeça que é a evolução das doenças causadas pelo PCV-2 (SEGALÉS *et al*., 2013). Acredita-se que as alterações nos genótipos do PCV-2 são um importante fator de falha vacinal em muitas granjas. Outro fator

sugerido seria a coinfecção com o PCV-3, mas essa teoria ainda precisa ser esclarecida (KU *et al.*, 2017).

O genoma do PCV-3 tem sido detectado em animais de várias idades e sua prevalência varia de 6,8% a 59,4%, conforme o material usado na detecção (KIM *et al*., 2017; ZHENG *et al*., 2018a). Em relação à idade do animal, a menor presença (5%) foi encontrada em animais da maternidade (STADEJEK *et al.*, 2017) e a maior presença (49,3%) em animais da creche (KWON *et al*., 2017). Entretanto, um estudo recente conduzido na Espanha demonstrou que a frequência não foi diferente entre as idades dos animais (KLAUMANN *et al*., 2018a).

Após as primeiras descrições do PCV-3 na América do Norte (PHAN *et al*., 2016; PALINSKI *et al*., 2016), outros países da Europa, Ásia e América do Sul também relataram a presença do vírus em suínos domésticos e selvagens (FACCINI *et al*., 2017; KU *et al*., 2017; STADEJEK *et al*., 2017; FRANZO *et al*., 2018b; FU *et al*., 2018; TOCHETTO *et al*., 2018; KLAUMANN *et al*., 2019b; VARGAS-BERMUDEZ *et al*., 2019) (Figura 8).

Figura 8 – Mapa com a distribuição geográfica do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3). Em vermelho, os países onde o vírus foi detectado até o final de 2018.
Fonte: Klaumann et al., 2018a.

O PCV-3 já foi detectado em soro e tecidos de suínos afetados por várias manifestações clínicas como problemas respiratórios, falhas reprodutivas, miocardite, síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) e tremores congênitos (PHAN *et al*., 2016; KU *et al*., 2017; PALINSKI *et al*., 2017; CHEN *et al*., 2018). Além disso, o vírus também já foi detectado em animais assintomáticos (FRANZO *et al*., 2017; ZHAI *et al*., 2017; ZHENG *et al*., 2018a).

Estudos retrospectivos revelam a circulação do PCV-3 em 1993 na Suécia (YE *et al*., 2018) e em 1996 na Espanha e na China (KLAUMANN *et al*., 2018a; SUN *et al*., 2018). Mais recentemente, uma pesquisa realizada no Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, Universidade Federal Fluminense (UFF), detectou o PCV-3 em amostras de tecido de suíno parafinado datadas de 1967 (RODRIGUES, 2019).

O PCV-3 já foi detectado, por PCR, em amostras de fluido oral, *swab* nasal, fezes, sêmen, tecidos, colostro e soro (FRANZO *et al*., 2017, 2018a; KU *et al*., 2017; KWON *et al*., 2017; KEDKOVID *et al*., 2018; KLAUMANN *et al*., 2018b).

Coinfecções do PCV-3 com PCV-2, Torque Teno vírus Suíno, Parvovírus suíno e o vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV) já foram descritas em animais com e sem sinais clínicos (HA *et al.*, 2018; KIM *et al*., 2018b; ZHENG *et al*., 2018b; SUKMAK *et al*., 2019). Artigos publicados apresentam evidências que coinfecções por PCV-3 com outros patógenos, como TTSuV-1 por exemplo, podem estar associadas ao aumento da patogenicidade do vírus em suínos (PALINSKI *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2017).

Contrariando a ideia de que o PCV-3 infecta apenas os suídeos, o PCV-3 já foi encontrado em soro de cachorros, camundongos e bovinos (JIANG *et al.*, 2019; WANG *et al*., 2019; ZHANG *et al*., 2017). Entretanto, ainda não há evidências de que o vírus cause doenças em outras espécies (KLAUMANN *et al*., 2018b).

No Brasil, o PCV-3 foi descrito em um *pool* de soros coletados de porcas que apresentavam quadro de problemas reprodutivos em duas propriedades no sul do país (TOCHETTO *et al*., 2018) e em amostras de tecido coletadas em nove estados brasileiros produtores de suínos (MT, MS, GO, MG, ES, SP, PR, SC e RS) (SARAIVA *et al.*, 2019).

Diferentes estudos têm apontado possíveis origens para o PCV-3. Fu et al. (2018) sugerem um evento de recombinação entre os circovírus de morcegos e suínos selvagens há mais de 215 anos. Entretanto, Saraiva et al. (2018), não encontraram resultados que apontem a recombinação entre os circovírus de suínos e morcegos para a origem do PCV-3. Esses autores sugerem, por análise bayesiana de sequências moleculares, que o PCV-3 que circula atualmente teve origem entre os anos de 1946 e 1987, sendo o mais provável 1967, data essa corroborada por Rodrigues (2019). Eles demonstraram que o vírus tem uma origem diferente dos demais circovírus suíno, dividindo um ancestral comum com o circovírus dos morcegos, surgido há mais de 50 anos atrás (FU *et al*., 2018; LI, G. *et al.*, 2018; SARAIVA *et al*., 2018).

2.2.7 *Diagnóstico*

O primeiro passo no diagnóstico da circovirose envolve a observação dos sinais clínicos característicos das síndromes associadas ao PCV-2. Entretanto, os sinais clínicos são, na sua maioria, inespecíficos e comuns a outras doenças. Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial confirmatório é baseado em achados patológicos e virológicos (SEGALÉS, 2012; inserir).

No início dos anos 2000, técnicas moleculares em tecidos, por serem muito sensíveis, não apresentavam boa correlação com a enfermidade (PINTO, 2004). Diante disso, pesquisadores da Universidade de Barcelona (QUINTANA *et al.*, 2001; SORDEN, 2000) sugeriram a visualização de lesões histológicas em órgãos linfoides como diagnóstico (SOUZA *et al.*, 2008). As observações dessas lesões, em associação à detecção do DNA viral e/ou a detecção de antígenos e proteínas nesses tecidos, são, ainda hoje, consideradas os testes mais fidedignos para o diagnóstico da circovirose (QUINTANA *et al.*, 2001; SEGALÉS, 2012; SORDEN, 2000). Até 2012, a imunohistoquímica (IHQ) ainda era considerada a opção mais indicada para o diagnóstico da circovirose, com a detecção do antígeno viral nos tecidos dos animais infectados (SEGALÉS *et al.*, 2012).

A detecção molecular baseada na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitiu o diagnóstico do PCV-2 de uma forma rápida e sensível a partir de uma variedade de amostras, tais como soro, sangue, tecidos, sêmen, secreções nasais, amostras ambientais e tecidos fixados em formol (CRUZ *et al*., 2016; KARUPPANNAN e OPRIESSNIG, 2017; SEGALÉS, 2012). A PCR e *nested* PCR (nPCR) têm sido utilizadas para realizar estudos retrospectivos de detecção do PCV-2 (CHOI *et al.*, 2002; KIM e CHAE, 2001; KIM *et al.*, 2001; SHIBATA *et al.*, 2003).

A partir dos anos 2000, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) vem sendo utilizada para determinar a carga viral do PCV-2 em diversas amostras (NIELSEN *et al*., 2018; OLVERA *et al*., 2004; ROVIRA *et al*., 2002; YUAN *et al*., 2014), sendo considerada uma técnica mais sensível, mais simples e mais confiável que a PCR convencional (BRUNBORG *et al*., 2004; OLVERA *et al*., 2004). Tanto quanto sabemos, todos os sistemas de PCR em tempo real descritos até agora são baseados na amplificação parcial da ORF2 (BRUNBORG *et al.*, 2004; OLVERA *et al*., 2004; ROVIRA *et al*., 2002; YUAN *et al*., 2014).

A detecção de anticorpos para PCV-2 no soro de suínos pode ser realizada pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA, sendo IFI a mais utilizada (BLANCHARD *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2002).

A detecção do PCV-3 tem sido realizada com técnicas moleculares como PCR e qPCR, e sua caracterização molecular é feita por sequenciamento (KLAUMANN *et al*., 2018a; LI *et al*., 2018b). A técnica de hibridização *in situ* foi utilizada em um estudo onde se observou a expressão do RNA viral em tecido cardíaco (PHAN *et al*., 2016). Tendo como alvo a proteína do capsídeo, um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores na China (DENG *et al*., 2018), enquanto outro grupo produziu um anticorpo monoclonal (LI *et al*., 2018a).

Para elucidar a patogenia do PCV-3, diferentes técnicas laboratoriais precisam ser testadas e padronizadas, já que as técnicas utilizadas atualmente dificultam afirmar que o PCV-3 está realmente relacionado às manifestações clínicas observadas nos animais (KLAUMANN *et al*., 2018b).

2.2.8 *Prevenção e controle*

Diferentes estratégias têm sido adotadas para a prevenção e controle das infecções pelo PCV-2, incluindo a vacinação (SEGALÉS *et al.*, 2013) e medidas de manejo (MADEC et al., 2000).

A vacinação dos animais passou a ser disponível a partir do final do ano 2000, o que tornou possível a redução do número de infecções e casos de doença por PCV-2 (SEGALÉS, 2015). Atualmente, quatro vacinas comerciais, todas baseadas em isolados de PCV-2a (SHEN *et al.*, 2012), estão disponíveis em todo o mundo (Quadro 1) (FAIM, 2019; GRAU-ROMA *et al.*, 2011).

Vários estudos demonstraram que a vacinação contra PCV-2, mesmo em um quadro de PCV2-SI, é capaz de aumentar os parâmetros de produção (ganho de peso diário, condição corporal e peso da carcaça) (YOUNG *et al.*, 2011). Dessa forma, o uso da vacina vem alterando um cenário de graves surtos (1997-2007) para um cenário de infecções auto limitantes com surtos ocasionais (FIGUERAS-GOURGUES *et al*., 2019).

O uso da vacinação em porcas e marrãs com a vacina inativada e com adjuvante oleoso oferece imunidade ao leitão através da transferência passiva de anticorpos para PCV-2. Além disso, diminui a circulação e eliminação do agente durante as primeiras semanas de vida do leitão (CASTRO *et al.*, 2007). Charreyre et al. (2006) observaram uma redução da taxa de mortalidade por circovirose suína de 50% nos animais entre desmame e fim da terminação na maioria de 150 granjas francesas e alemãs que incluíram a vacinação nas suas práticas.

Além da vacinação para PCV-2 especificamente, o uso de vacinas e tratamentos direcionados para as coinfecções virais, como para Parvovírus, e bacterianas, como para *Mycoplasma hyopneumoniae*, também minimizam o impacto do PCV-2 nas granjas (SEGALÉS, 2012).

Em 2008, chegou no Brasil uma vacina inativada para circovirose suína que oferecia proteção para os PCV-1 e PCV-2, indicada para leitões, e que vem sendo utilizada até os dias de hoje. Essa formulação permitiu manter a segurança do PCV-1 não patogênico, enquanto estimulava a resposta imune contra o PCV-2 (CIB, 2007). Em 2019, a primeira vacina PCV-2b produzida com isolados brasileiros foi lançada no país, apresentando maior identidade sequencial com as ORF2 de PCV-2b e PCV-2d, o que aumenta a probabilidade de proteção cruzada da vacina (FAIM, 2019).

Quadro 1 - Vacinas para prevenção da infecção por PCV-2.

Vacina	Empresa	Antígeno	Administração	Recomendação
CIRCOVAC	Merial	PCV-2 Inativado	2 mL IM 2 doses	Fêmeas em cobertura
INGELVAC CIRCOFLEX	Boehringer Ingelheim	ORF2 PCV-2	1 mL IM dose única	Leitões > 3 semanas
PORCILIS PCV	Intervet-Schering	ORF2 PCV-2	2 mL IM dose única ou 2 doses	Leitões > 3 dias
SUVAXYN PCV-2	Fort Dodge Pfizer	Quimera PCV-1 e PCV-2 Inativada	2 mL IM dose única	Leitões > 4 semanas
SAFESUI CIRCOVÍRUS	Ourofino	ORF2 PCV-2b Inativada	1 mL IM 2 doses	Leitões > 3 semanas

IM= intramuscular. Fonte: GRAU-ROMA *et al*., 2011; FAIM, 2019.

Diferentes medidas de manejo têm sido adotadas para controlar a disseminação de PCV-2, diminuir o estresse animal, eliminar as coinfecções e minimizar os fatores que induzem a estimulação crônica do sistema imunológico (MADEC *et al.*, 2000). Dentre essas medidas, destacam-se a utilização do sistema "todos dentro todos fora", onde os animais de um mesmo lote ocupam e desocupam uma sala em um mesmo momento, a redução de introdução de novos animais no rebanho e no número de animais por m^2, a melhoria da qualidade de ar e controle da temperatura, a manutenção dos animais agrupados por leitegada durante as fases de crescimento e terminação, e a remoção de os animais doentes das baias.

O PCV-2, sendo um vírus não envelopado, é muito estável no ambiente. Entretanto, o uso de desinfetantes nas instalações e nos veículos de transporte ajuda no controle da sua

disseminação. Dentre os desinfetantes testados *in vitro*, aqueles a base de fenol, amônia quaternária, hidróxido de sódio e agentes oxidantes, diluídos em concentrações variadas, diminuíram o número de partículas virais em até 73,6% (ROYER *et al.*, 2001).

A disseminação do PCV-2 tem sido controlada através do uso de vacinas, cujo alvo é a proteína do capsídeo (FAIM, 2019). Mas dado que a identidade de nucleotídeos entre a proteína de capsídeo do PCV-3 e PCV-2 é inferior a 30%, é pouco provável que a vacina contra PCV-2 ofereça imunidade cruzada para PCV-3 (PALINSKI *et al*., 2016), assim a vigilância epidemiológica contínua é essencial para o controle da disseminação do PCV-3 (LI *et al*., 2018a). Entretanto, não existem estudos apontando formas de prevenção e controle para o PCV-3 até o momento.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar estudo molecular dos circovírus suíno tipos 2 (PCV-2) e 3 (PCV-3), através da quantificação e detecção do DNA do PCV-2 e detecção molecular do PCV-3, a partir de amostras de soro de suínos dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Brasil, coletadas entre os anos de 2013 a 2018.

3.2 ESPECÍFICOS

- Implementar a PCR em tempo real para a detecção e quantificação de PCV-2 no Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, UFF, utilizando sistema de sondas de hidrólise *TaqMan*® e curva sintética, em amostras de soro de suínos.
- Comparar a técnica da qPCR com a *nested* PCR na detecção molecular do PCV-2.
- Correlacionar a carga viral do PCV-2 com os aspectos clínicos e epidemiológicos dos animais.
- Estabelecer uma técnica de *nested* PCR para a detecção do PCV-3.
- Realizar a detecção molecular do PCV-3 em amostras de soro de suínos coletadas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.
- Estudar a relação entre a presença de PCV-3 e os aspectos clínicos e epidemiológicos dos animais.
- Estudar os casos de coinfecção entre o PCV-3 e outros agentes virais importantes na suinocultura (Circovírus suíno tipo 2, Torque teno vírus suíno tipos 1 e 2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

Esse estudo tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense (UFF) sob o número 2491130718 (Anexo 1).

4.2 AMOSTRAS

Para a realização deste estudo, foi utilizado o total de 208 amostras de sangue de suínos. Cento e quarenta e nove amostras foram usadas para detecção e quantificação de PCV-2 e 154 foram usadas para detecção molecular do PCV-3. As amostras foram coletadas em 37 propriedades localizadas em 21 municípios da região Sudeste do Brasil, 16 do Rio de Janeiro e 5 do Espírito Santo, nos anos de 2013, 2014, 2017 e 2018 (Quadro 2).

Deste total, 164 amostras foram obtidas entre os anos de 2013 e 2014 para um estudo anterior (CRUZ *et al*., 2016), que foi conduzido em 32 propriedades localizadas em 16 municípios de cinco mesorregiões do estado do Rio de Janeiro (RJ) (Figura 9). Foram percorridos mais de 2.000 km em um total de dez dias para a realização da coleta das amostras de sangue. Devido à baixa tecnificação da maior parte das granjas visitadas, foi possível visitar de duas a três granjas diariamente, coletando as amostras de sangue. Todas essas amostras foram testadas para PCV-2, TTSuV-1 e TTSukV-2 por PCR.

As demais 44 amostras foram coletadas em 2017 e 2018 em animais do estado do Espírito Santo (ES). Nesse período, foram visitadas cinco propriedades em cinco municípios localizados na região sul do estado (Figura 10). A escolha da região sul do ES para as coletas deu-se pelos seguintes fatores: proximidade da divisa entre os dois estados, o que pode favorecer a transmissão de patógenos, maior concentração de propriedades na região e economia de recursos e de tempo. Como as granjas deste estado são mais tecnificadas que as do RJ e apresentam um nível de biosseguridade mais rigoroso, a entrada nas granjas só foi permitida com intervalo de vazio sanitário mínimo de 15 dias entre elas. Dessa forma, o número de propriedades visitadas foi menor para esse estado.

Quadro 2 - Relação dos estados, municípios e número de propriedades visitadas e número de amostras obtidas para o desenvolvimento do estudo.

ESTADO	MUNICÍPIOS	NÚMERO DE PROPRIEDADES	NÚMERO DE AMOSTRAS
Rio de Janeiro	Angra dos Reis	2	11
	Barra Mansa	2	14
	Bom Jesus do Itabapoana	2	10
	Cachoeira de Macacu	2	17
	Campos dos Goytacazes	3	19
	Cantagalo	1	3
	Duque de Caxias	1	5
	Itaperuna	1	2
	Miracema	3	11
	Nova Iguaçu	1	4
	Pinheiral	1	3
	Posse	1	19
	Rio Claro	6	32
	São Francisco do Itabapoana	1	7
	São Gonçalo	1	2
	Valença	4	5
Espírito Santo	Alegre	1	6
	Castelo	1	11
	Jerônimo Monteiro	1	7
	Muqui	1	10
	Vargem Alta	1	10
TOTAL	21	37	208

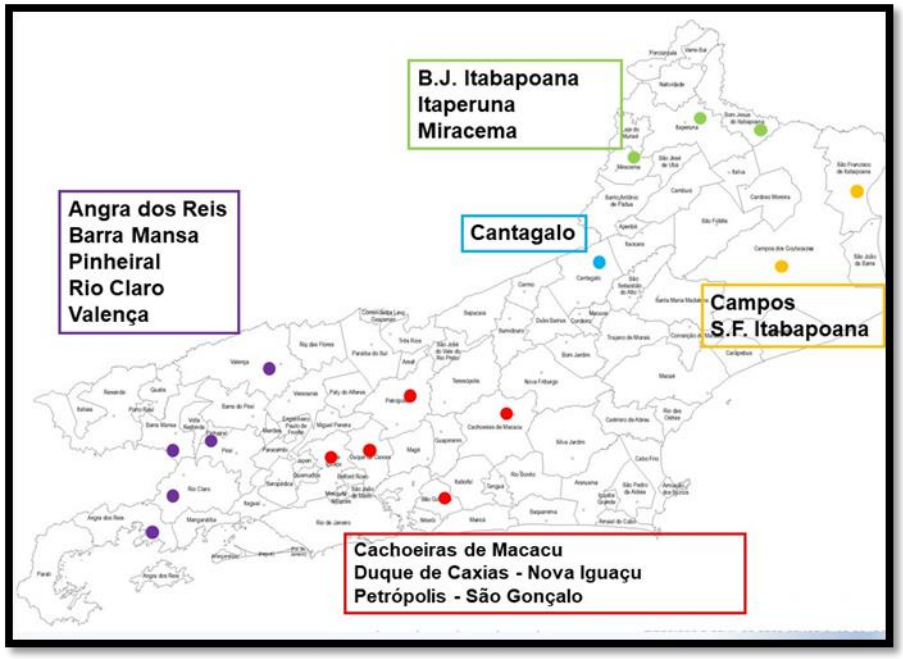


Figura 9 - Mapa do estado do Rio de Janeiro com o número de municípios visitados por mesorregião. Elaborado pela autora com base no mapa disponível em IBGE.

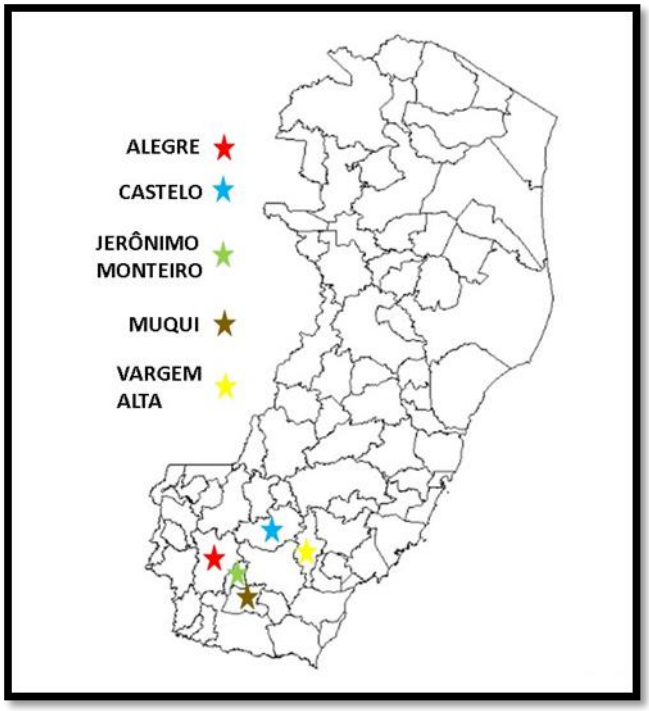


Figura 10 - Mapa do estado do Espírito Santo com a localização dos municípios visitados. Elaborado pela autora com base no mapa disponível em IBGE.

4.2.1 *Critério de inclusão dos animais*

O critério de inclusão dos animais para o estudo anterior (CRUZ *et al.,* 2016) e para este estudo foi o aspecto corporal do animal no momento da coleta da amostra de sangue. Animais com peso adequado para a fase de produção em que se encontravam e animais visualmente magros, todos de um mesmo lote, foram separados aleatoriamente por avaliação visual (Figura 11). Todos eles foram então pesados, sendo o valor aferido registrado em banco de dados para posterior análise.

Figura 11 - Animais separados para coleta de amostra de sangue. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a separação, todos os animais selecionados foram examinados pelo Médico Veterinário responsável pela coleta das amostras de sangue e a presença ou ausência de sinais clínicos foram anotadas em ficha clínica, assim como a data de nascimento e o sexo dos mesmos. Os sinais clínicos observados nos animais no momento do exame estão descritos no quadro 3. Os animais do estudo foram também classificados em diferentes fases de produção de acordo com a idade: creche (idade 21 a 70 dias), recria (idade 71 a 110 dias) e terminação (a partir de 111). Nenhum dos animais incluídos no estudo recebeu a vacina contra PCV-2.

Quadro 3 - Classificação dos sinais clínicos observados nos animais no momento da coleta.

Sinal clínico	Descrição
Ausência de sinais	Nenhum sinal observado
Entéricos	Diarreia com ou sem presença de sangue
Locomotores	Claudicação e/ou artrite e/ou bursite
Respiratórios	Tosse e/ou espirro e/ou secreção nasal
Multissistêmicos	Entéricos + respiratórios, entéricos + locomotores, respiratórios + locomotores, entéricos + respiratórios + locomotores

4.2.2. *Coleta das amostras*

A coleta das amostras de sangue para a obtenção do soro foi realizada por punção da veia jugular externa (CAPRIOLI *et al.*, 2006) (Figura 12). Foram utilizados tubos de coleta contendo EDTA e agulhas 25x7 mm e coletados aproximadamente 2mL de sangue de cada animal.

As amostras foram mantidas sob resfriamento em gelo até a chegada ao Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, da Universidade Federal Fluminense. No laboratório, elas foram centrifugadas a 1.000 rpm/10 min para a obtenção do soro, que foi separado em alíquotas de 200µL e armazenado em freezer até a extração do DNA.

Figura 12 - Coleta de amostra de sangue por punção da veia jugular externa. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.3 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O DNA total foi extraído a partir de 200µL de soro do animal utilizando o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*® (Roche, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os produtos da extração foram estocados em freezer até o momento de sua utilização.

4.4 IMPLEMENTAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV-2) EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

Para esta etapa do estudo foram incluídos 125 animais com peso abaixo do esperado e 24 com peso adequado. Em relação às amostras, foram selecionadas 123 amostras usadas no estudo anterior e que apresentavam volume de soro suficiente para uma nova extração de DNA, e 26 amostras coletadas para este estudo. A quantidade total de 149 amostras selecionadas foi definida com base na quantidade de reagentes disponíveis para a realização das reações de *nested* PCR e PCR em tempo real (Figura 13).

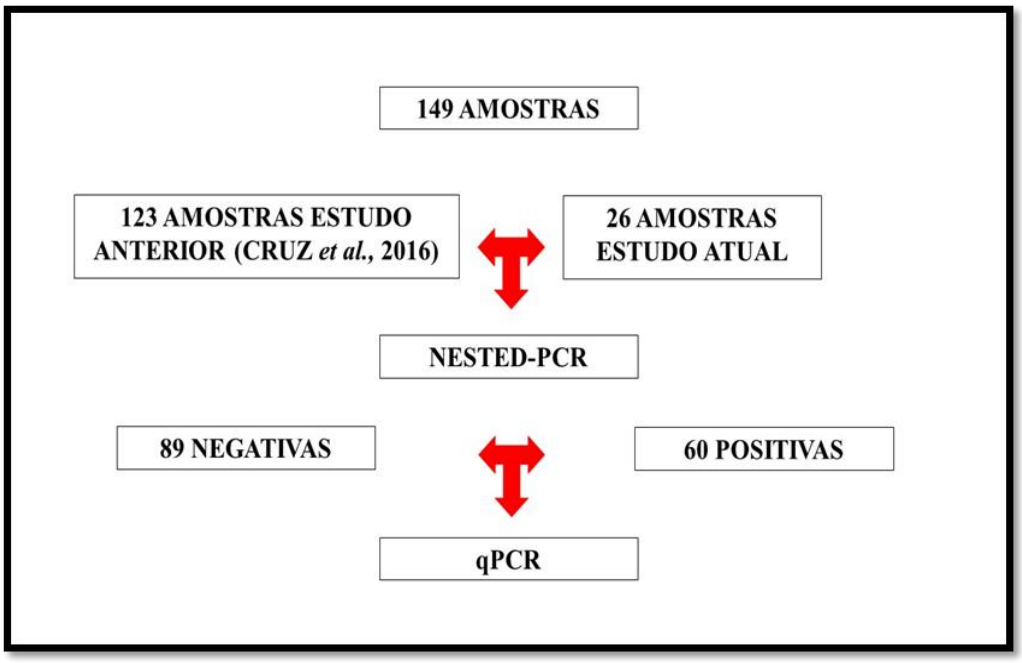


Figura 13 - Fluxograma com a distribuição das amostras utilizadas para detecção e quantificação do Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2).

A implementação da qPCR com sistema de sondas de hidrólise *TaqMan Universal Master Mix ll with UNG* (*Applied BioSystems*®) foi baseada em protocolo previamente publicado (OLVERA *et al.*, 2004), com iniciadores e sondas direcionados para a região de ORF-2 do PCV-2, e na utilização de curva padrão sintética (Quadro 4).

A curva sintética foi desenhada no programa *GeneArt*, disponível no *site* http://www.lifetechnology.com/genesynthesis, sob assessoria da *Applied BioSystems*®, e sintetizada em um DNA plasmidial de 2.486 pares de base (pb) contendo o inserto de 112 pb da sequência do PCV-2 (Figura 13). A sequência que codifica o gene do capsídeo disponível no *Genbank* através do número de acesso AF465211 foi utilizada como modelo para o desenho da curva sintética.

Quadro 4 - Iniciadores, sonda e curva padrão utilizados na reação de qPCR para detecção e quantificação de PCV-2 utilizados neste estudo.

Iniciador Sonda Curva sintética	Sequência	Posição	Região	Tamanho do amplicon	Referência
PCV-2-F **PCV-2-R** **PCV-2-S**	CCAGGAGGGCGTTGTGACT CGCTACCGTTGGAGAAGGAA AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT	(1535-1633)	Cap	98 pb	Olvera et al., 2004
Curva sintética	GTTAGGTTGGATGAACTACCCGCCA ATCAGCATGTGGTAACCGTTAATTCG GTGTTTGATTTGGCCTGGGCTGTTCG TCGTCATCTCACACTGGCAGGGCAGT TTCAAGCTATCAGAGCCGCATATGAT GTG			112 pb	Este estudo

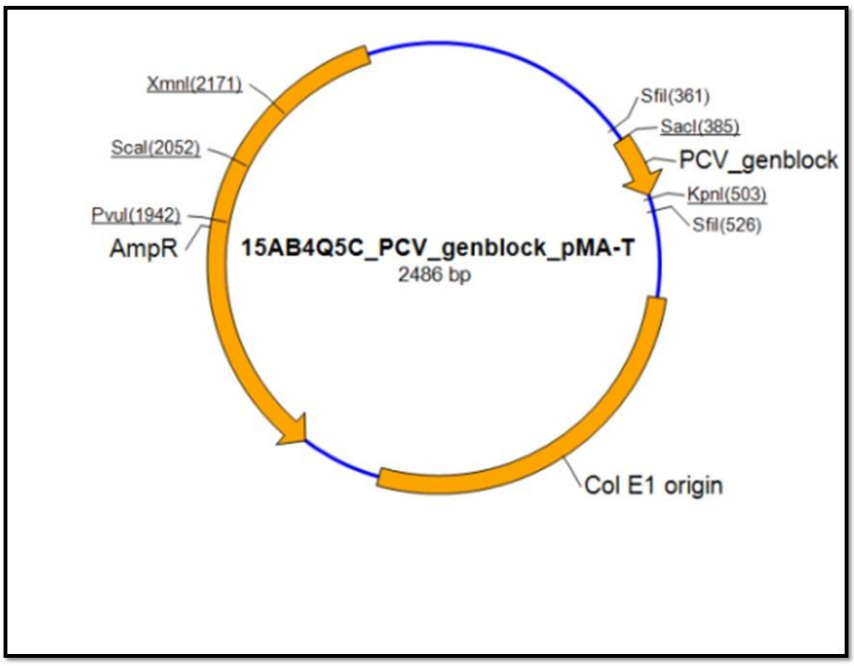


Figura 14 - Plasmídeo de 2.486 pb com inserto de 112 pb do gene que codifica a proteína de capsídeo do PCV-2. Fonte: Life Technologies - GeneArtSupport

O DNA plasmidial liofilizado foi diluído em 200 µL de tampão TE pH8,0. O número de cópias genômicas (CG) foi calculado a partir da concentração de DNA medida previamente no aparelho Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, EUA) e conforme os cálculos do programa URI Genomics & Sequencing Center, disponível em http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html:

Número de cópias-alvo (moléculas/µL) = [concentração em g/µL / (número de pares de bases x peso molecular médio de um par de bases)] x número de Avogadro

A partir da concentração inicial obtida para o DNA plasmidial, foram realizadas diluições seriadas na base 10, nas concentrações de 10^0 a 10^{-9} CG/µL. As diluições da curva foram submetidas às reações de amplificação para PCV-2 e os parâmetros de qualidade das curvas-padrão geradas foram analisados para avaliar a confiabilidade dos resultados.

As condições de reação foram as mesmas indicadas por Olvera et al. (2004) e foram realizadas com o conjunto de reagentes *TaqMan® Universal Master Mix ll with UNG* (*Applied BioSystems®*) (Quadro 5). As reações foram realizadas em plataforma *Step One Software v2.3® (Applied BioSystems®*) e as condições de amplificação da qPCR foram 95º C por 10 min, um ciclo de 50º C por 2 min e 40 ciclos de 95º C por 15 s e 60º C por 1 min (OLVERA *et al*., 2004).

Quadro 5 - Reagentes utilizados na reação de qPCR para amplificação do gene que codifica a proteína do capsídeo do PCV-2.

Reagentes	**Volume por reação**
TaqMan® Universal Master Mix ll with UNG	12,5 µL
Primer PCV2F (10µM)	1µL
Primer PCV2R (10µM)	1µL
Sonda PCV2S (FAM-QSY) (10µM)	0,5µL
H_2O DNAse/RNAse *free* (Promega)	5 µL
Volume final	**20µL**

4.4.1 *Detecção e quantificação viral do PCV-2 em amostras de soro*

O protocolo estabelecido com a curva padrão foi aplicado às amostras selecionadas para essa etapa do experimento. Todos os ensaios para detecção e quantificação do PCV-2 nas amostras de soro, incluíram controle negativo e curva padrão sintética. Todas as amostras, curva padrão e controle negativo foram testados em duplicata.

4.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR EM TEMPO REAL E *NESTED* PCR NA DETECÇÃO DO PCV-2

Para comparar a sensibilidade e a especificidade das técnicas moleculares deste estudo foram utilizadas as mesmas 149 amostras da etapa de implementação da qPCR. As amostras foram submetidas a PCR em tempo real e *nested* PCR e os resultados foram analisados estatisticamente. Os escores da qPCR e o *Nested* PCR foram analisados pela Receiver Operating Characteristic (curva ROC) que possibilitou a determinação da nota de corte pela combinação matemática de maior especificidade e sensibilidade.

4.6 DETECÇÃO MOLECULAR DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3)

Para essa etapa do estudo, foram usadas 154 amostras, 113 amostras de um estudo anterior (CRUZ *et al.*, 2016) e 41 coletadas para este estudo (Figura 15). O critério para a seleção das amostras foi o mesmo usado na seleção das amostras para a primeira etapa do trabalho.

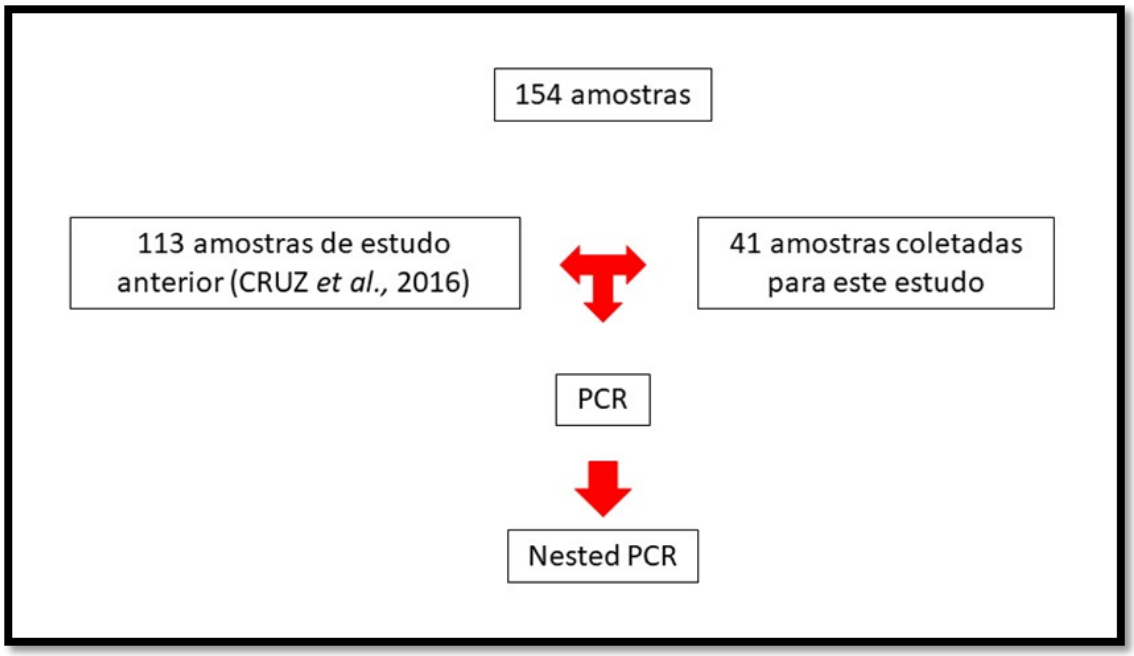


Figura 15 - Fluxograma com a distribuição das amostras usadas para detecção do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3).

Para a detecção do PCV-3, foi realizado um estudo piloto com 10 amostras de soro dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Foi utilizado um protocolo de PCR com os pares de iniciadores PCV3-1-F e PCV3-1-R, que amplificam um fragmento de 649pb do gene que codifica a proteína do capsídeo (KU *et al.*, 2017). Não foi observada banda no gel de agarose (Figura 16).

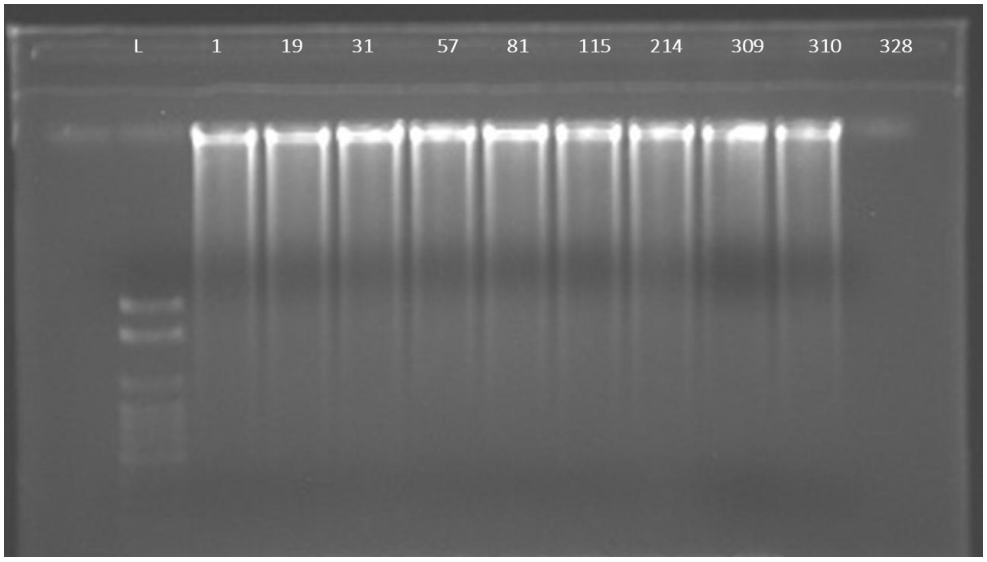


Figura 16 – Gel de agarose evidenciando a ausência de banda de 649pb após a PCR convencional para PCV-3 com amostras de soro de suínos

Para confirmar o resultado obtido, o mesmo protocolo foi realizado com amostras de tecido congelado (Figura 17).

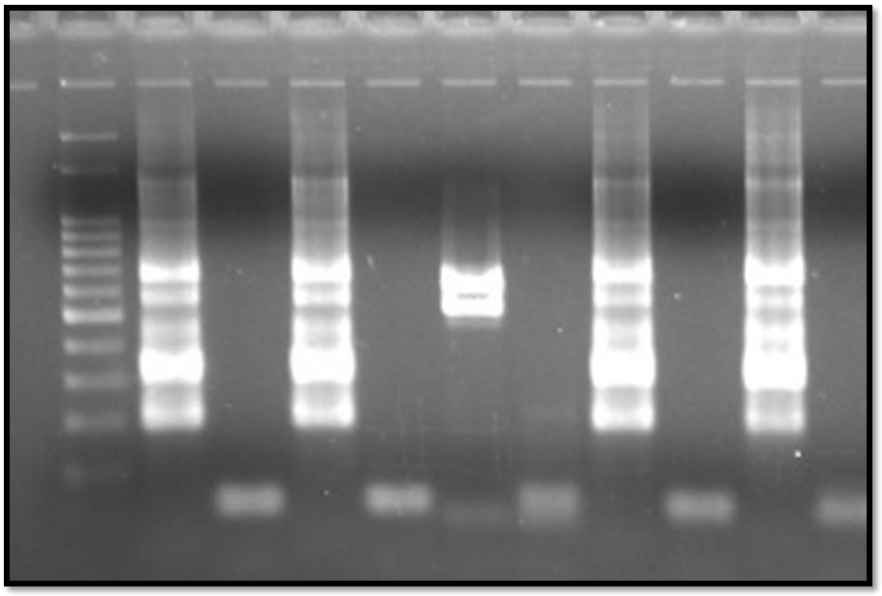


Figura 17 – Gel de agarose evidenciando a presença de banda de 649pb após a PCR convencional para PCV-3 com amostras de tecido congelado.

4.7 DESENVOLVIMENTO DA *NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3) EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

Para aumentar o limite de detecção do PCV-3 nas amostras de soro foi desenvolvida uma *nested* PCR que amplifica um fragmento de 203pb da região de capsídeo. Os iniciadores (PCV3-NF e PCV3-NR) (Quadro 6) foram desenhados com o programa *Prime 3 software* (disponível em http://primer3.sourceforge.net/) e a sequência molde do gene que codifica o capsídeo do PCV-3 (ORF2) de número de acesso KY076027no *GenBank*.

Quadro 6 - Iniciadores utilizados nas reações de *nested* PCR para amplificação parcial do gene que codifica a proteína Cap para detecção do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3).

Iniciador	Sequência	Posição	Região	Tamanho do amplicon	Referência
PCV3-NF **PCV3-NR**	CCATTGAACGGTGGGGTCAT TGGACCACAAACACTTGGCT	(1363-1382) (1970-1948)	Cap	203 pb	Este estudo

Foram adicionados 5µL do produto da primeira reação a 15µL da mistura de reagentes (Quadro 7). Uma reação de gradiente para a escolha da melhor temperatura de anelamento foi realizada. Com o resultado obtido, foram definidas as seguintes condições para as reações: desnaturação inicial a 94ºC por 5 min, 35 ciclos a 94ºC/30 s, 52ºC/30 s e 72ºC/1 min, com uma extensão final de 72°C por 10 min. Todas as reações foram realizadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*®).

Quadro 7 - Reagentes utilizados nas reações de *nested* PCR para detecção do Circovírus Suíno tipo 3 (PCV-3).

Reagentes	Volume por reação
H_2O DNAse/RNAse *free* (Promega)	3,0µL
Master Mix GoTaq™ (Promega)	11,0µL
Iniciador PCV3-1-F/PCV3-NF 20pmol/µL	0,5µL
Iniciador PCV3-1-R/PCV3-NR 20pmoL/µL	0,5µL
Volume final	**15µL**

A especificidade dos novos iniciadores foi confirmada através do sequenciamento de quatro amostras (RJ019, RJ031, ES309 e ES310) que apresentaram banda sugestiva após a reação de *nested* PCR. O sequenciamento bidirecional foi realizado pela Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, Brasil) utilizando o sequenciador automatizado ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e reagente o BigDye v3.1(Applied Biosystems, Foster City, CA). O software BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi foi utilizado para avaliar a similaridade destes produtos a sequências mundiais disponíveis no GenBank.

Para confirmar a sensibilidade da *nested* PCR, foi utilizada uma amostra de tecido congelado, previamente testada e positiva para PCV-3, cuja concentração do DNA foi verificada em Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, EUA). Após diluições seriadas na base 10, a amostra foi submetida ao protocolo de *nested* PCR estabelecido neste estudo.

O protocolo foi aplicado nas amostras selecionadas para o estudo. Como controles positivos para o PCV-3 foram utilizadas as amostras RJ019, RJ031, ES309 e ES310 (este estudo). Como controle negativo da reação foi utilizada água bidestilada deionizada Milli-Q®.

4.7.1 *Eletroforese em Gel de Agarose*

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TAE 1,0X (GIBCO-BRL®) por 90 minutos a 70 volts. As imagens foram registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas das cargas virais obtidas para PCV-2 foram analisadas em escala logarítmica na base 10, já que a variação dos dados foi elevada. A fim de se testar quais parâmetros influenciaram a variável dependente (carga viral), foi aplicado um modelo linear matemático que incluiu os efeitos de fase de produção, sintomas e a associação entre as fases de produção e os sintomas. Posteriormente, foram realizadas as comparações dentro das fases de produção e sinais clínicos para as estimativas médias pelo LSD (menor diferença de significância). Para comparação das técnicas moleculares foram calculadas a sensibilidade, a especificidade e o coeficiente Kappa (concordância).

Para PCV-3, a frequência de animais positivos com relação aos sinais clínicos e fase de produção foi analisada pelo teste de Chi quadrado, sendo considerado o nível de significância de 5%. Não foram realizadas análises estatísticas para peso e coinfecções. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 IMPLEMENTAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV-2)

A partir das diluições seriadas da curva sintética (Figura 18), estabeleceu-se um valor para o ciclo *threshold* (Ct) para cada carga viral nas concentrações entre 3.3 x 10^0 até 3.3 x 10^9 cópias genômicas por 25µL de reação. Os valores de coeficiente de regressão linear (R^2), variável dependente (Y), *slope* e a taxa de eficiência (Eff) para as curvas padrão foram de 0.991, 40.876, -3.42 e 96.048, respectivamente (Figura 19). Foram consideradas positivas as amostras com Ct inferior ou igual a 39,00, de acordo com critério pessoal.

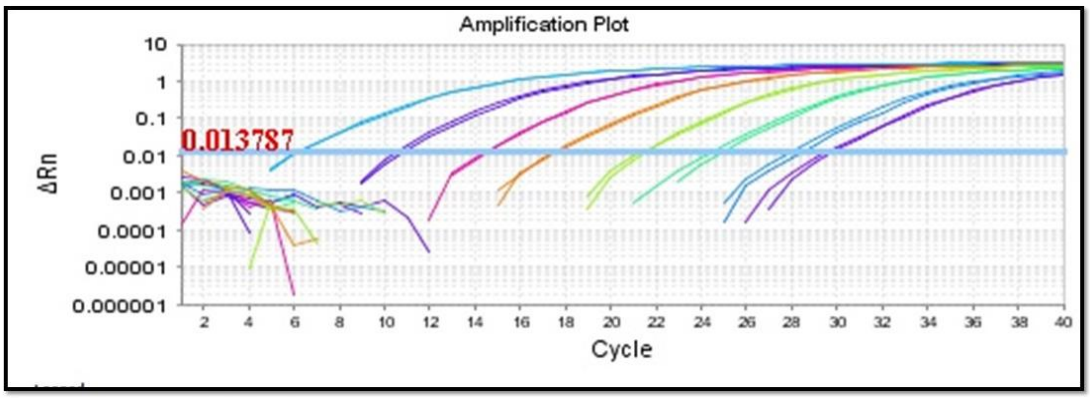


Figura 18 - Gráfico de amplificação genômica estabelecido pelo programa *StepOne v.2.3*® (Applied Biosystems, Waltham, Massachussetts, EUA) para as curvas sintéticas de PCV-2 em diluições seriadas de 3.3 x 10^9 até 3.3 x 10^2 CG/reação.
O número em vermelho indica o *threshold* obtido na reação.

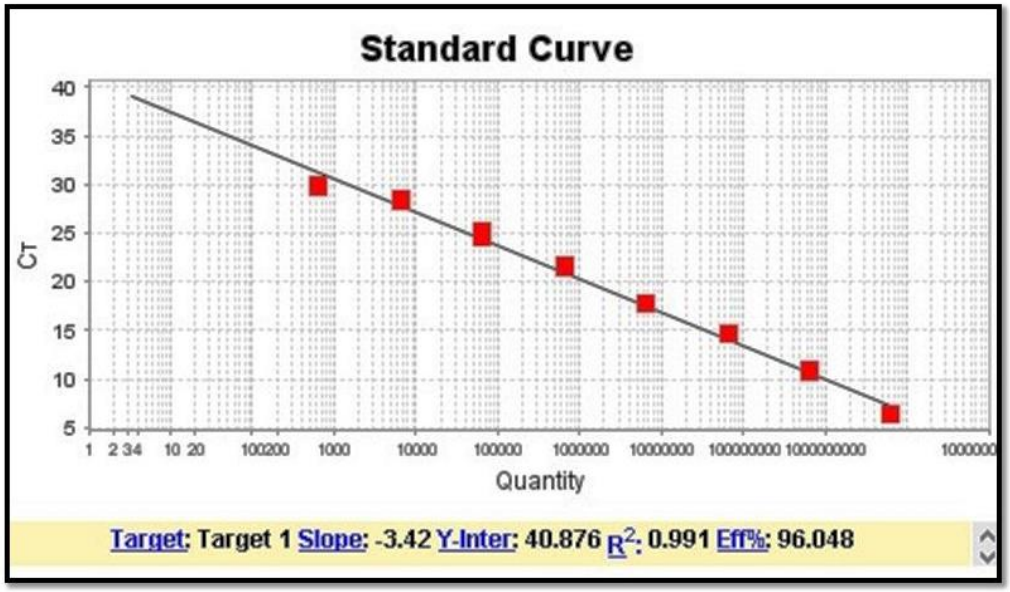


Figura 17 - Imagem gráfica demonstrando os valores de inclinação da reta (*slope)*, intercept (Y), coeficiente de regressão linear (R^2) e eficiência (Eff) estabelecidos pelo programa *StepOne v.2.3*® (Applied Biosystems, Waltham, Massachussetts, EUA) para as curvas padrão sintéticas de Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2) nas diluições de 10^{-2} a 10^{-9}.

A reprodutibilidade deste estudo ficou assegurada, uma vez que os resultados do coeficiente de regressão linear para os ensaios de quantificação de DNA para o PCV-2 foram superiores a 0.9, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Valores relativos aos coeficientes de regressão linear (R^2) obtidos para os oito ensaios realizados para quantificação de DNA do PCV-2.

Ensaio	R^2	Ensaio	R^2
1	0,991	5	0,984
2	0,951	6	0,971
3	0,983	7	0,977
4	0,914	8	0,988

5.2 DETECÇÃO DE PCV-2 E COMPARAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL COM A *NESTED* PCR

Os resultados para a detecção do PCV-2 por *nested* PCR e qPCR, nas amostras selecionadas, estão apresentados na tabela 2. Comparando os dois métodos moleculares utilizados nesse estudo, uma concordância geral dos resultados foi encontrada em 73,15% dos casos (109/149). Não foi observada diferença estatística entre o desempenho das duas técnicas (p=0,81) pelo teste de Chi-Quadrado.

Tabela 2 - Resultados para a detecção do PCV-2 em soro de suíno por *nested* PCR e qPCR das 149 amostras estudadas.

		***Nested* PCR**		
		(+)	**(-)**	**Total**
qPCR	**(+)**	39	19	58
	(-)	21	70	91
	Total	60	89	149

Concordância = 73,15% (109/149)

Sensibilidade = 65% (39/60)

Especificidade = 78,65% (70/89)

O valor encontrado para a área sob a curva ROC, que constitui uma medida do desempenho ou exatidão do teste, foi satisfatório (71%) (Gráfico 1), além de ter permitido a comparação entre esses dois testes de diagnóstico. O melhor ponto de corte em função da sensibilidade e especificidade encontra-se representado no Gráfico 2 pelo encontro das duas linhas no mesmo, sendo que os valores encontrados a partir desta maior otimização dos parâmetros foi 65% de sensibilidade e 78,65% de especificidade.

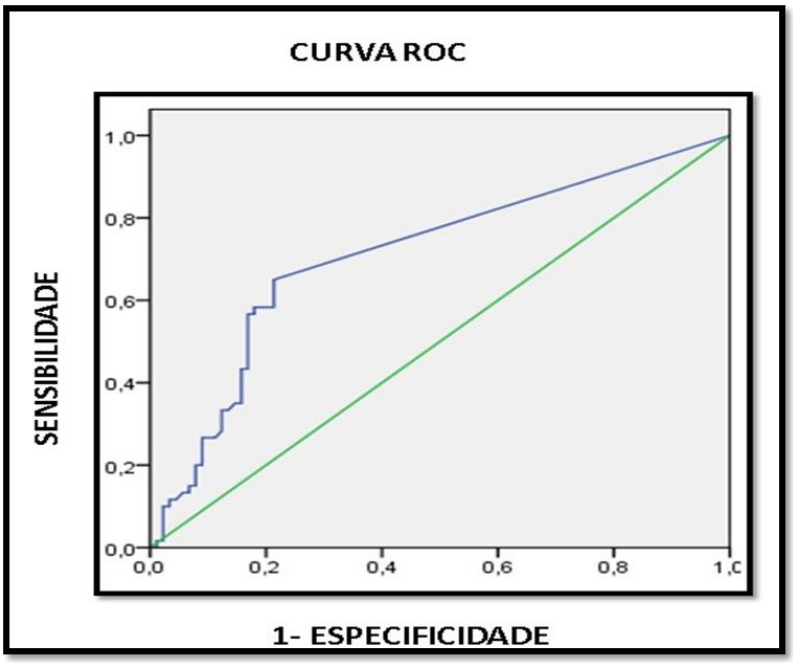


Gráfico 1 – Curva ROC com os valores de sensibilidade e especificidade encontrados na comparação das técnicas moleculares usadas na detecção do Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2).

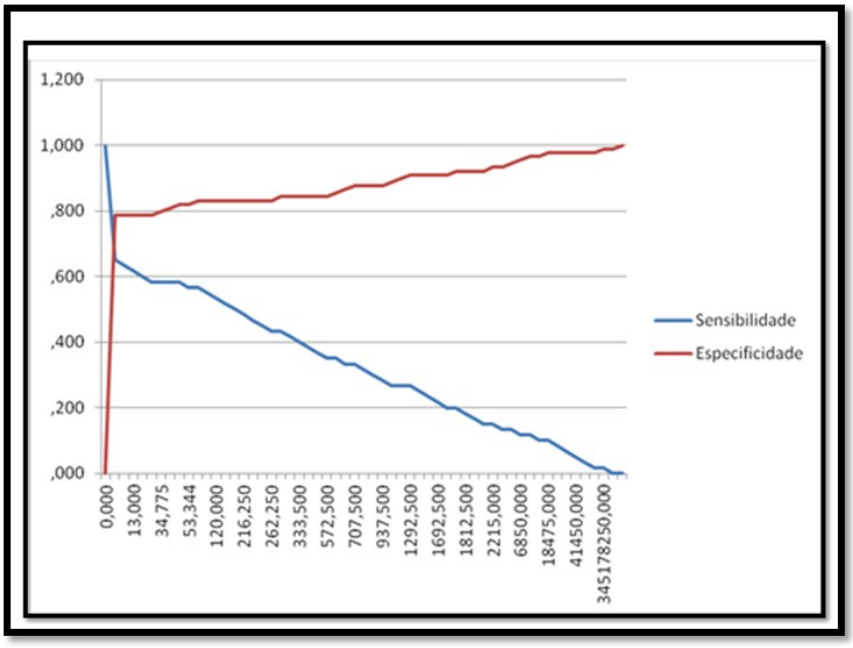


Gráfico 2 – Representação do melhor ponto de corte em função da sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas para detecção do Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2). Gráfico elaborado em Excel.

Das 58 amostras positivas para PCV-2 por qPCR, 6,90% (4/58) eram do ES e 93,10% (54/58) do RJ. Em relação ao *nested* PCR, das 60 amostras positivas para PCV-2 11,66% (7/60) ES e 88,34% (53/60) RJ.

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL DO PCV-2 E ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS ANIMAIS TESTADOS

Cinquenta e oito de 149 animais (38,92%) foram positivos pela qPCR. O PCV-2 foi quantificado em 44/84 (52,38%) dos animais sintomáticos, com carga viral média e desvio-padrão de $1.39x10^4$ (±0.386) CG/mL. Nos animais assintomáticos, a carga viral média detectada em 14/65 (21,53%) foi de $2.45x10^2$ com desvio-padrão de ±0.425 por CG/mL. A carga viral média e o desvio-padrão encontrados nos animais assintomáticos e sintomáticos encontram-se na Tabela 3. Comparando os sintomas apresentados pelos animais, somente os sintomas entéricos apresentaram associação estatística com a carga viral encontrada (p=0,001).

Dos 58 animais positivos pela qPCR, 51 (87,93%) estavam abaixo do peso esperado para a idade, enquanto sete (12,06%) apresentavam peso acima ou dentro do esperado para a idade. A carga viral média dos animais com baixo peso foi de $1.45x10^4$ CG/mL, e a dos animais com peso acima ou dentro do esperado foi de $1.30x10^8$ CG/ml. Dos 91 animais negativos pela PCR quantitativa, 73 (80,22%) apresentavam peso abaixo do esperado e, desses, apenas 15 animais (20,55%) eram do Espírito Santo.

Quando analisada a carga viral em relação à idade dos animais, não foi observada diferença estatística (p=0,387) (Tabela 4).

A carga viral média encontrada nos animais do RJ foi de 9,60E+06 CG/mL, já nos animais do ES foi de 2,92E+02 CG/mL.

Tabela 3 - Carga viral média, desvio-padrão e variação da carga viral do PCV-2 em relação aos sinais clínicos.

Sinais clínicos	Carga viral média (DP) (CG/mL**)**		Variação da carga viral (CG/mL**)**
Assintomáticos (n=14)	$2.45x10^2$ (±0.425)		$5.71x10^0 – 6.75x10^3$
Sintomáticos (n=44)	$1.39x10^4$ (±0.386)	Entéricos (n=10) $3.94x10^4$ (±0.393)[b]	$2.54x10^2 – 7.40x10^8$
		Respiratórios (n=24) $1.92x10^3$ (±0.345)[a]	$1.45x10^1 – 3.54x10^4$
		Múltiplos (n=10) $3.30x10^2$ (±0.420)[a]	$2.84x10^1 – 4.22x10^4$

Letras diferentes entre linhas significam diferença estatística ($p<0.05$) DP – Desvio Padrão, CG/mL – Cópias genômicas/ml

Tabela 4 - Carga viral média, desvio-padrão e variação da carga viral do PCV-2 em relação às fases de produção.

Fases de produção	Carga viral média (DP) CG/mL	Variação da carga viral (CG/mL)
Creche (n=13)	$1.26x10^3$ a (± 0.438)	$3.41x10^1 – 1.78x10^4$
Recria (n=120)	$2.52x10^3$ a (± 0.207)	$1.16x10^1 – 7.40x10^8$
Terminação (n=16)	$5.9x10^2$ a (± 0.422)	$5.71x10^0 – 3.57x10^5$

Letras diferentes entre linhas significam diferença estatística ($p<0,05$)

5.4 ESTABELECIMENTO DA *NESTED* PCR PARA A DETECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3 (PCV-3)

Após estabelecimento do protocolo da *nested* PCR para detecção do PCV-3, 10 amostras foram testadas, tendo sido observada banda sugestiva de 203pb em quatro delas (Figura 20). Essas amostras foram enviadas para sequenciamento e com o uso do software *BLASTn* foi observada 100% de similaridade das amostras sequenciadas (RJ019, RJ031, ES309 e ES310) com outras sequências de PCV-3 disponíveis no GenBank (Figura 21).

Figura 20 – Gel de agarose evidenciando as bandas sugestivas de PCV-3 encontradas em quatro amostras usadas (RJ019, RJ031, ES309 e ES310).

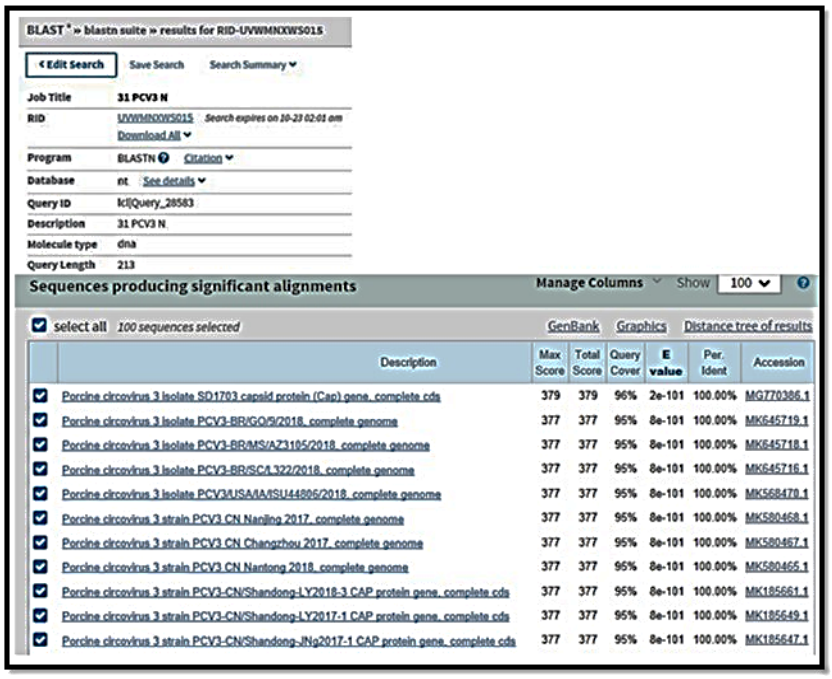


Figura 21 - Alinhamento gerado no software BLASTn entre a sequência de PCV-3 obtida nesse estudo (amostra RJ031) e demais sequências protótipos disponíveis no GenBank.

O limite de detecção dos iniciadores desenhados (PCV3-NF e PCV3-NR) foi avaliado a partir da realização da *nested* PCR com nove diluições na base 10 de DNA extraído a partir de uma amostra de tecido congelado de um estudo anterior (dados não publicados). A concentração do DNA na amostra de tecido foi de 243,5 ng/µL e foi observada amplificação do fragmento alvo na *nested* PCR em concentração mínima de 24,3 fg do DNA (Figura 22).

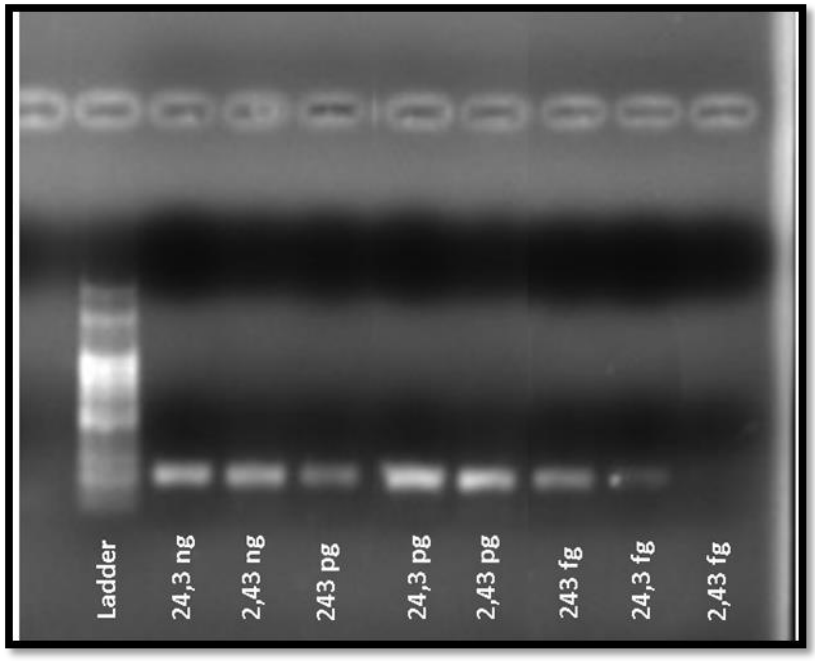


Figura 22 - Gel de agarose evidenciando o limite de detecção da *nested* PCR para PCV-3 em amostra de tecido congelado. Linha 1: marcador de peso molecular. Linhas 2-9: diluições seriadas na base 10 da amostra de tecido. Ng= nanograma, pg= picograma, fg= fenograma

5.5 DETECÇÃO MOLECULAR DO PCV-3 EM AMOSTRAS DE SORO DE SUÍNOS

Das 154 amostras de soro utilizadas para detecção do PCV-3, 41 (26,62%) apresentaram resultado positivo. Das 41 amostras positivas, 24 (58,54%) eram do estado do Rio de Janeiro, e 17 (41,46%) do estado do Espírito Santo. O PCV-3 foi detectado em 15/31 (48,38%) das granjas visitadas. O número de regiões, municípios e propriedades de cada estado, onde o PCV-3 foi detectado, encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados para a detecção do PCV-3 por estado analisado.

	Rio de Janeiro Nº de positivos/N° total (%)	Espírito Santo Nº de positivos/N° total (%)
Regiões	4/5 (80%)	1/1 (100%)
Municípios	8/15 (53,33%)	4/5 (80%)
Propriedades	11/26 (42,30%)	4/5 (80%)

No que se refere às fases de produção, o PCV-3 foi mais detectado na recria (28/41). Entretanto, não houve associação estatística significativa entre a presença do vírus e as fases de produção (p=0.357) (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos resultados gerais para PCV-3 de acordo com a fase de produção, os sinais clínicos e o sexo dos animais.

	PCV-3	**p**
Fases de produção	**N/41 (%)**	**0,357**
Creche (n=21)	7/41(17,07)	
Recria (n=114)	28/41(68,30)	
Terminação (n=19)	6/41(14,63)	
Sinais clínicos		**0,0179***
Entéricos (n=22)	0	
Multissistêmicos (n=16)	5/41 (12,20)	
Respiratórios (n=45)	16/41 (39,02)	
Sem sinais (n=71)	20/41 (48,78)*	
Sexo		**0,985**
Fêmeas (n=77)	19/41 (46,34)	
Machos (n= 77)	22/41 (53,66)	

*significativo a 5%

Dos 154 animais utilizados nesse estudo, 83 (53,89%) apresentavam algum sinal clínico (45 sinais respiratórios, 22 sinais entéricos e 16 sinais multissistêmicos), enquanto 71 (46,10%) animais não apresentavam qualquer sinal clínico. Das 41 amostras positivas, 21 (51,22%) eram de animais sintomáticos e 20 amostras (48,78%) eram de animais assintomáticos, sendo somente observada associação estatística significativa quando relacionados os animais assintomáticos com a presença do vírus (p=0.017) (Tabela 6).

Analisando o sexo dos animais em relação aos animais positivos, 46,34% das fêmeas e 53,65% dos machos foram positivas para PCV-3. O sexo dos animais não teve efeito significativo na positividade do PCV-3 (p=0.985) (Tabela 6).

Dos animais positivos para PCV-3, 32 (78,05%) estavam com peso abaixo do esperado para a idade e 13 (31,70%) apresentavam coinfecção entre PCV-3 e 2. Dos animais negativos, 95 estavam com peso abaixo do esperado e, desses, 36 eram PCV-2 positivos.

Devido aos diferentes manejos encontrados nas granjas visitadas, o peso dos animais não foi considerado para análise estatística.

Coinfecções PCV-3 e PCV-2, TTSuV-1 e TTSuV-2 foram observadas em 13 (31,7%), 19 (46,3%) e 14 (34,1%) amostras, respectivamente. A coinfecção entre os quatro vírus foi observada em 3 (7,3%) amostras, sendo uma amostra de um animal assintomáticos e duas amostras de animais com sinais respiratórios. Dos animais assintomáticos e positivos para PCV-3, em 12/20 (60%) foram observadas coinfecções. Dos 16 animais com sinais respiratórios e positivos para PCV-3, em 81,25% (13/16) foram observadas coinfecções. Em relação aos animais com sinais múltiplos, 5/5 apresentaram coinfecções. Os resultados gerais para as coinfecções encontradas estão na tabela 7. Não foi realizada análise estatística para coinfecções.

Tabela 7 - Distribuição dos resultados gerais para as coinfecções encontradas de acordo com os sinais clínicos, a fase de produção e o sexo dos animais.

	PCV-3				
Sinais Clínicos	**PCV-2**	**TTSuV-1**	**TTSuVk-2**	**Todos**	**p**
Múltiplos (n= 5)	3/5 (60%)	4/5 (80%)	1/5 (5%)	0	
Respiratórios (n= 16)	8/16 (50%)	7/16 (43,75%)	5/16 (31,25%)	2/16 (12,50%)	
Sem sinais (n= 20)	2/20 (10%)	8/20 (40%)	8/20 (40%)	1/20 (5%)	
Fases de produçao					
Creche (n= 7)	1/7 (14,28%)	3/7 (42,85%)	3/7 (42,85%)	0	
Recria (n= 28)	8/28 (28,57%)	15/28 (53,57%)	7/28 (25%)	2/28 (7,14%)	
Terminação (n= 6)	4/6 (66,67%)	1/6 (16,67%)	4/6 (66,67%)	1/ (16,67%)	
Sexo					
Fêmea (n= 19)	4/19 (21,05%)	10/19 (522,63%)	6/19 (31,57%)	0	
Macho (n= 22)	9/22 (40,90%)	9/22 (40,90%)	8/22 (36,36%)	3/22 (13,63%)	

6 DISCUSSÃO

6.1 CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2

O uso da qPCR com sondas de hidrólise e curva padrão sintética no diagnóstico e quantificação do PCV-2 se mostrou executável no Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus, UFF. Neste estudo, 38,9% (58/149) dos animais foram considerados positivos pela técnica de qPCR com iniciadores que amplificam parcialmente o gene que codifica a proteína do capsídeo. As técnicas de biologia molecular possuem altas sensibilidade e especificidade e a qPCR é considerada mais sensível que a *nested* PCR graças ao uso da sonda fluorescente para detecção de amplificação do produto. Além disso, por não ser necessária uma avaliação pós amplificação, a probabilidade de contaminação é reduzida na qPCR (BRUNBORG *et al*., 2004; OLVERA *et al*., 2004). A reprodutibilidade deste estudo ficou assegurada uma vez que os resultados dos coeficientes de regressão linear (R^2) foram superiores a 0,9 para cada concentração e sua respectiva média (MACHADO *et al.*, 2016; MARTINS, 2016).

Desde 2013, a *nested* PCR é utilizada no Laboratório de Virologia Animal e Parvovírus - UFF para detecção do PCV-2 em soro de suínos, com excelente resultado (CRUZ *et al*., 2016). Neste trabalho, o desempenho das técnicas de qPCR e *nested* PCR foi comparado a partir de amostras de soro de suínos. Os resultados encontrados comprovam que não existe diferença significativa entre as técnicas (p=0.81), como já publicado anteriormente (SILVA *et al*., 2011; YUAN *et al*., 2014). A área sob a curva ROC, que constitui uma medida do desempenho ou exatidão dos testes analisados (MARTINEZ *et al.,* 2003), apresentou um resultado satisfatório, além de ter permitido a comparação entres os dois testes moleculares usados nesse estudo, confirmando não haver diferença na sensibilidade e especificidade apresentadas pelos mesmos.

Apesar de não termos encontrado diferença estatística entre as técnicas executadas, o fato da qPCR apresentar vantagens como tempo reduzido de processamento, resultado com uma única reação, além da diminuição da manipulação das amostras, demonstra que vale a pena introduzir o método em laboratórios onde exista infraestrutura para isso, modernizando, assim, o diagnóstico de PCV-2 no Brasil. Quanto à sensibilidade das técnicas usadas nesse trabalho, não há relatos na literatura de que o tamanho do produto amplificado interfira na sensibilidade das mesmas (ALBERT e FENYO, 1990; LORENZ, 2012; SEDLACKOVA *et al*., 2013).

Com a aplicação da qPCR na quantificação de PCV-2 em soro usada neste estudo, ficou claro que animais com diarreia apresentavam carga viral maior que os animais assintomáticos, o que já foi previamente observado (BARÓ *et al.*, 2015; BRUNBORG *et al*., 2004; OLVERA *et al*., 2004). Apesar disso, ainda hoje a quantificação do PCV-2 no soro é usada apenas como indicativo da infecção (OLVERA *et al*., 2004; SEGALÉS *et al*., 2005), o que torna necessário a necropsia dos animais e a realização da IHQ, que é uma técnica mais demorada, para confirmação de diagnóstico.

Durante muito tempo, o PCV-2 foi implicado como causador de doenças entérica, devido à presença de enterite granulomatosa alterando a permeabilidade da parede intestinal e levando a quadros de diarreia (BARÓ *et al.*,2015; ZLOTOWSK *et al.,* 2008). Entretanto, devido à atividade imunossupressora do PCV-2, atualmente considera-se que problemas entéricos apresentados pelos animais (diarreia) PCV-2 positivos, são parte do quadro sistêmico da circovirose, não sendo considerados uma patologia à parte (BARÓ *et al.,* 2015). Tal fato é corroborado pelos achados desse estudo, onde a associação entre animais com diarreia e a carga viral do PCV-2 apresentou significância estatística. Entretanto, não é possível afirmar que o PCV-2 é o único causador da diarreia já que outros agentes causadores de diarreia não foram testados neste estudo.

O PCV-2 é um dos patógenos mais importantes em suínos, causando perdas econômicas importantes devido ao atraso na produção ou pela ocorrência de infecções respiratórias secundárias (CIACCI-ZANELLA, 2017). A doença do complexo respiratório dos suínos (PRDC) apresenta, como característica principal, a presença de vários agentes envolvidos, sendo o PCV-2 um deles. Na maioria dos casos, dificilmente distinguem-se doenças do complexo respiratório suíno e circovirose, uma vez que ambos são clinicamente muito semelhantes (CASTRO *et al.,* 2007; SEGALÉS *et al*., 2013). Associado a isso, 18 animais que apresentavam sinais respiratórios no momento da coleta, haviam sido previamente diagnosticados com pneumonia enzoótica relacionada à presença da bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* (dados não demonstrados). Esses dados podem explicar o fato de que não foi observada associação estatística entre os animais com problemas respiratórios e a carga viral do PCV-2 neles encontrada.

Fatos que continuam intrigando os pesquisadores desde o início dos anos 2000 são os possíveis mecanismos envolvidos na manifestação clínica da circovirose, uma vez que animais positivos para PCV-2 podem não apresentar nenhum dos sinais característicos da doença (ALLAN e ELLIS, 2000). A importância da infecção subclínica por PCV-2 tem sido muito estudada, já que essa é a situação mais comum nas granjas de suínos. Os suínos com

infecção subclínica (PCV2-SI) albergam e excretam baixas cargas sistêmicas de PCV-2 e tal condição parece estar relacionada com a diminuição do ganho médio diário de peso (LÓPEZ-SORIA *et al*., 2014). Além disso, esses animais podem estar alojados junto a outros que sejam mais suscetíveis ao vírus, vindo a desenvolver a forma clínica da infecção. Nesse estudo, para os animais assintomáticos foi observada uma carga viral média de 10^2, semelhante à encontrada para os animais com sintomas múltiplos, confirmando a importância dos animais com infecção subclínica dentro das granjas.

Passados quase 40 anos de sua descoberta, o PCV-2 continua sendo economicamente importante para a suinocultura por sua alta morbidade e por causar perda de peso em animais de creche e recria (SEGALÉS *et al*., 2005). Nesse trabalho, foi observado que 51 (87,93%) dos animais positivos para PCV-2 estavam abaixo do peso esperado, confirmando a associação do vírus com o atraso no ganho de peso, como já descrito anteriormente (CRUZ *et al*., 2016; LÓPEZ-SORIA *et al*., 2014).

De acordo com Lyoo et al. (2012), a presença de animais com peso baixo e negativos para PCV-2, pode estar associada a fatores nutricionais, de manejo, genéticos ou à presença de outros agentes patogênicos, como por exemplo, *Mycoplasma hyopneumoniae.* Em nosso trabalho observamos que dos 73 animais negativos para PCV-2 e com peso baixo, apenas 15 (20,55%) eram do Espírito Santo, onde o manejo observado nas propriedades era mais adequado do que o das propriedades do Rio de Janeiro, onde a maioria das propriedades visitadas apresentava um manejo deficiente.

Esse foi o primeiro trabalho a realizar a quantificação do PCV-2 em amostras de soro de suínos nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, gerando um artigo submetido (ANEXO 2).

6.2 CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 3

O PCV-3 foi inicialmente descrito em 2015 e artigos a respeito da detecção e circulação desse vírus em diferentes amostras clínicas de suínos de diferentes países foram publicados a partir de 2016 (PALINSKI *et al.,* 2016; PHAN *et al.,* 2016), Em 2017, quando esse estudo estava em desenvolvimento, em função da falta de informação a respeito desse agente no Brasil e diante da possibilidade do PCV-3 causar um impacto econômico tão importante quanto o PCV-2, surgiu o interesse em pesquisar a presença do PCV-3 nas amostras de soro de suínos do Rio de Janeiro e Espirito Santo, disponíveis em nosso laboratório.

Inicialmente, o diagnóstico molecular adotado em nosso laboratório foi baseado em uma reação de PCR convencional tendo como alvo a região da ORF2 (capsídeo viral) (KU *et al*., 2017). Essa metodologia apresentou resultados positivos em tecidos congelados (dados deste estudo), porém não se mostrou adequada para a detecção do PCV-3 em amostras de soro de suínos e tecidos formolizados emblocados, provavelmente pela reduzida carga viral e pela degradação do material genético nas amostras. Em 2000, Mankertz et al. publicaram um estudo sugerindo que, usando-se soro como amostra, o teste de PCR poderia não detectar o PCV-2 em todos os animais infectados. Os autores partiram da premissa de que o circovírus não é persistente em animais infectados (ALLAN *et al.,*1995) e que por isso a PCR somente detectaria a infecção na fase aguda.

Para verificar se isso aconteceria com PCV-3, decidiu-se desenvolver uma *nested* PCR para testar as amostras de soro. O desenho dos iniciadores para a *nested* PCR, visando aumentar a detecção do PCV-3 em nossas amostras, foi determinante para os nossos resultados positivos. A alta sensibilidade da reação utilizando dos iniciadores desenhados neste trabalho, foi comprovada visto que o limite de detecção da reação de *nested* PCR desenvolvida para este estudo foi de 24,3fg, maior do que o limite de detecção de 20,5ng da reação de PCR descrita anteriormente por Ku et al. (2017).

O primeiro estudo molecular de PCV-3 realizado no Brasil foi baseado em amostras de soro obtidas no Sul do país em duas granjas (TOCHETTO *et al*., 2018). Um segundo estudo realizado em nove estados brasileiros (SARAIVA *et al*., 2019) descreveu a presença do vírus em todos os estados analisados, incluindo o Espírito Santo, onde 2/2 amostras foram positivas para PCV-3. Entretanto, esse é o primeiro estudo a descrever a presença do PCV-3 no Rio de Janeiro.

Diferentes estudos reportam a prevalência do PCV-3 em amostras clínicas diversas**,** com percentuais variando de 1,85% a 65% (HAYASHI *et al.,* 2018; QI *et al.*,2019; SARAIVA *et al.,* 2019; WEN *et al.,* 2018; ZHAI *et al.,* 2017; ZOU *et al.,* 2018). Estudos usando soro como amostra clínica demonstraram prevalências variando de 28,7% a 65% (KU *et al.,* 2017; PALINSKI *et al*., 2016; STADEJEK *et al*., 2017). Nesse estudo, o PCV-3 foi detectado em 26,62% das amostras de soro de animais saudáveis e com sintomatologia clínica variada, de ambos os sexos, e com peso e idades variadas, com uma prevalência pouco menor do que a observada na China, nos Estados Unidos e na Polônia (KU *et al.,* 2017; PALINSKI *et al*., 2016; STADEJEK *et al*., 2017). De fato, de acordo com Klaumann et al. (2019a), ainda não existe um padrão específico de infecção por PCV-3 que possa ser inferido a partir da frequência do mesmo.

A presença de PCV-3 nas granjas estudadas (48,38%) está dentro da variação dos percentuais de 9,6% a 100% observados para países como Brasil, Coreia do Sul, Polônia, Japão e China (HAYASHI *et al.,* 2018; KIM *et al*., 2018a; KWON *et al.,* 2017; QI *et al.,* 2019; SARAIVA *et al*., 2019; STADEJEK *et al.*,2017; SUKMAK *et al.,* 2019; TOCHETTO *et al.,* 2018; ZOU *et al.,* 2018;). Nas granjas positivas para PCV-3, pesquisadores poloneses (STADEJEK *et al.,* 2017) encontraram uma prevalência variando de 5,9% a 65% em amostras de soro, enquanto nosso trabalho apresentou uma prevalência variando de 2,43% a 14,63%, similar à apresentada por Guo et al. (2019) em granjas na China. A prevalência do PCV-3 nos municípios visitados é semelhante aos valores já publicados anteriormente na China e na Polônia (QI *et al.,* 2019; STADEJEK *et al.,* 2017), não tendo sido associado a presença do vírus com as características geográficas das regiões.

Essa variação encontrada na prevalência do PCV-3, tanto nas amostras quanto nas granjas, pode estar relacionada ao número e tipos de amostras usadas nos estudos citados, à situação epidêmica da região avaliada, ao manejo usado nas granjas, assim como na sensibilidade da técnica empregada para detecção do vírus (SAPORITI *et al.,* 2019; SARAIVA *et al.,* 2019).

Assim como observado para o PCV-2 neste estudo, a maior prevalência de animais positivos para PCV-3 foi observada na recria (68,30%). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o vírus e as fases de produção. Embora existam diversas publicações relatando a frequência do PCV-3 em diferentes idades (KIM *et al*., 2017; ZHENG *et al*., 2018a), não é possível comparar esses dados, visto que as informações obtidas têm origem em diferentes países, tipos de propriedades e manejos diferentes (KLAUMANN *et al.*,

2019a). O que se pode sugerir é que a infecção por PCV-3 é ubíqua dentro das granjas, afetando animais de todas as idades (KLAUMANN *et al*., 2019a; SUKMAK *et al.,* 2019).

Em relação aos sinais clínicos, nossos resultados apontam que 100% dos animais com diarreia foram negativos para PCV-3. Resultados diferentes foram encontrados por Zhai et al. (2017) com 17,1% dos animais, com diarreia, positivos para PCV-3, e Qi et al. (2019) com 10,4% dos animais com diarreia, testados por PCR convencional, positivos para PCV-3. Neste último estudo, os autores não afirmam que o vírus seja o agente primário da diarreia, já que outros agentes causadores de doenças entéricas, como o PCV-2, não foram pesquisados (QI *et al.,* 2019). Entretanto, devido à alta sensibilidade da reação de *nested* PCR desenvolvida para este estudo, nosso resultado permite afirmar que o PCV-3 não era o causador da diarreia nos 22 animais testados, visto não ter sido observado um único animal positivo para o vírus. Além disso, 6/22 (27,28%) dos animais com diarreia deste estudo eram positivos para PCV-2. Sabe-se que o PCV-2 causa diarreia nos animais devido à presença de lesões no intestino (ZLOTOWSKI *et al.,*2008). Entretanto, mesmo tendo sido detectado em intestino delgado (JIANG *et al.,* 2019), ainda faltam, até o momento, evidências de que o PCV-3 provoca as mesmas lesões que o PCV-2.

Quanto aos animais assintomáticos, a positividade do PCV-3 encontrada é de 1,85% a 29,8% na China e Espanha (GUO *et al.,* 2019; QI *et al*., 2019; SAPORITI *et al.,* 2019; WEN *et al*., 2018; ZHAI *et al.,* 2017). Em um estudo publicado recentemente no Brasil, foi encontrada uma frequência de PCV-3 em 29,8% dos animais sem sinais clínicos (SARAIVA *et al.,* 2019). Em nosso estudo, os animais assintomáticos apresentaram uma associação estatística significativa com a presença do vírus, sugerindo que, assim como o PCV-2, o PCV-3 causa infecções subclínicas. Baseado em dados publicados até o momento, não está estabelecido se a infecção por PCV-3 está relacionada a uma condição patológica particular ou a alguma idade específica (KLAUMANN *et al.,* 2018b).

Em relação aos suínos domésticos, não foram encontrados artigos onde os pesquisadores avaliassem o peso e o sexo dos animais em relação à infecção por PCV-3, não sendo possível, portanto, fazer nenhuma comparação com os dados obtidos nesse trabalho. Entretanto, dos animais positivos para PCV-3, 75,6% apresentavam peso abaixo do esperado e coinfecção PCV-3 e 2 foi observada em 41.9% desses animais. Esses valores sugerem que futuras investigações a respeito do emagrecimento causado pelo PCV-2, devem incluir o PCV-3 (SUKMAK *et al.,* 2019). Dois artigos publicados na Europa (FRANZO *et al.,* 2018b; KLAUMANN *et al*., 2019b) fazem referência à infecção por PCV-3 *versus* sexo em javalis, sem analisar os dados. Ouyang et al. (2019) sugerem que a infecção por PCV-3 não tem

associação com a condição corporal do animal, sexo ou idade, mas está associado a sinais clínicos. Entretanto, ainda não se sabe se o PCV-3 é capaz de induzir um quadro clínico tão complexo quanto o causado pelo PCV-2 (HA *et al.,* 2018). Como ainda são escassos os dados sobre a infecção por PCV-3, a comparação mais óbvia da dinâmica da infecção pelo PCV-3 é com a do PCV-2 (KLAUMANN *et al.,* 2019a).

Alguns fatores de risco relacionados ao PCV-2 foram levantados em estudos realizados na França e no Brasil (CRUZ *et al.,* 2016; SEGALÉS *et al.,* 2013) e, dentre eles, destacam-se: coinfecções com o TTSuV-2; presença de porcas infectadas (a taxa de mortalidade em leitegadas oriundas de porcas infectadas é maior), sexo (macho são mais suscetíveis quando comparados às fêmeas) e baixo peso ao nascer (leitão com baixo peso ao nascer tende a desenvolver a doença com maior frequência) (SEGALÉS *et al.*, 2013). Entretanto, estudos mais aprofundados a respeito da presença do PCV-3 nos suínos domésticos ainda são necessários para fecharmos conclusões a respeito da infecção relacionada a esse vírus.

Os resultados obtidos em nosso estudo para as coinfecções estão dentro do observado em outras regiões, entretanto, não foram realizadas análises estatísticas para verificar a associação entre o PCV-3 e os demais vírus. Segundo Ouyang et al. (2019), coinfecções são comuns em granjas de suínos, mas são necessários mais estudos para avaliar a importância do PCV-3 nessas coinfecções. Estudos publicados demonstram que existe uma alta taxa de coinfecção do PCV-3 com outros agentes (GUO *et al.,* 2019; HA *et al.,* 2018; KIM *et al.,* 2018b; OUYANG *et al.,* 2019a; SUKMAK, *et al.,* 2019; ZHENG *et al.,* 2018a). Entre esses agentes, o TTSuV é um dos mais presentes em animais PCV-3 positivos, com taxas de coinfecção variando entre 8,6% a 83,3% em animais doentes e saudáveis (HA *et al*., 2018; ZHENG *et al*., 2018b). Estudos também apontam a taxa de coinfecção do PCV-3 com PCV-2 variando de 1,26% a 61,54%, (CHEN *et al*., 2019; FU *et al*., 2018*;* HA *et al*., 2018; KIM *et al.,* 2017; SARAIVA *et al.,* 2019; SUKMAK *et al*., 2019; ZHENG *et al*., 2018b).

Apesar de recentemente descoberto, a presença do PCV-3 circulando entre os suínos desde 1967 foi evidenciada por Rodrigues em 2019. A detecção do vírus em amostras coletadas no ano de 2013 no estado do Rio de Janeiro confirma a presença do PCV-3 neste estado e sugere que o vírus circula mesmo em locais onde a suinocultura não é tão desenvolvida.

Em nosso trabalho foi possível confirmar a circulação de ambos os vírus nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo e foi observado que os vírus apresentam comportamentos distintos. Muitos estudos ainda precisam ser realizados sobre a dinâmica do PCV-3, mas

acreditamos que esse trabalho pode ajudar os produtores a melhorarem o manejo sanitário das granjas, diminuindo a circulação desses vírus entre os animais, e reduzindo, assim, o impacto econômico que a infecção pelos mesmos pode causar.

7 CONCLUSÕES

- A técnica de qPCR para diagnóstico e determinação de carga viral de PCV-2 com o uso de sonda de hidrólise e curva padrão sintética se mostrou executável podendo ser aplicada na rotina do diagnóstico de PCV-2 a partir de soro de suínos.
- A detecção e quantificação do PCV-2 em amostras de soro de suínos dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, por qPCR, foi realizada com sucesso.
- As técnicas de *nested* PCR e qPCR apresentaram valores de especificidade e sensibilidade similares, sendo ambas indicadas como um método de diagnóstico para PCV-2.
- Foi observada a correlação entre a carga viral do PCV-2 e os animais com diarreia e nenhuma associação foi observada entre carga viral e sinais clínicos respiratórios e multissistêmicos.
- Não foi observada associação entre carga viral de PCV-2 e fases de produção.
- A *nested* PCR para a detecção do PCV-3 foi estabelecida e apresentou maior sensibilidade em relação a PCR.
- Foi observada associação estatística entre o PCV-3 e os animais assintomáticos e todos os animais com diarreia foram negativos para o vírus.
- Não foi observada associação entre o PCV-3 e o sexo e a idade dos animais.
- A coinfecção entre o PCV-3 e PCV-2, TTSuV-1 e TTSuV-2 foi observada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCS – ver Associação Brasileira dos Criadores de Suínos.

ABIPECS – ver associação Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

ABPA – ver Associação Brasileira de Proteína Animal.

ALBERT, J.; FENYO, E.M. Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 7, p. 1560-1564, 1990.

ALARCON, P.; RUSHTON, J.; WIELAND, B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine,* v. 110, n. 2, p. 88-102, 2013.

ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 1, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; McNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovírus. *Zentralblatt für Veterinarmedizin B,* v. 41, n. 1, p. 17-26, 1994.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; CASSIDY, J.P.; REILLY, G.A.; ADAIR, B.; ELLIS, W.A.; MCNULTY, M.S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology,* v. 44, n. 1, p. 49-64, 1995.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, n. 1, p. 3-10, 1998.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.M.; KENNEDY, S.; MACKIE, D.P.; ELLIS, J.A.;CLARK, E.G.; ESPUNA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C.E. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 115-123, 1999.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MCMENAMY, M.; MCNAIR, I.; KRAKOWKA, S.G.; TIMMUSK, S.; WALLS, D.; DONNELY, M.; MINAHIN, D.; ELLIS, J.; WALLGREN, P.; FOSUM, C. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and

Northern Ireland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 19, n. 6, p. 668-673, 2007.

ANDRAUD, M.; GRASLAND, B.; DURAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A.; MADEC, F.; ROSE, N. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) within- and between-pen transmission in pigs. *Veterinary Research*, v. 39, n. 5, p. 43-55, 2008.

ASES – ver Associação de Suinocultores do Espírito Santo.

Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Relatórios Anuais da Abipecs. Disponível em: www.abipecs.org.br/relatorios.html Acesso em 06 de Outubro de 2014.

Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf Acesso em: 30 de set de 2019.

Associação de Suinocultores do Espírito Santo. Informativo disponível na página do site. Disponível em: http://www.associacoes.org.br/ases/historia-da-suinocultura Acesso em: 30 set 2019.

Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. Informativo disponível na página principal do site. Disponível em: https://issuu.com/revistaabcs/docs Acesso em: 30 de set de 2019.

BAO, F.; MI, S.; LUO, Q.; GUO, H.; TU, C.; ZHU, G.; GONG, W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV-2f. T*ransboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n. 2, p. 432-440, 2018.

BARBOSA, C.N.; FREITAS, T.R.P. Implementação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico do circovírus suíno tipo-2 (CVS-2). *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.7, n. 3, p. 211-219, 2008.

BARÓ, J.; SEGALÉS, J.; MARTÍNEZ, J. Porcine circovírus type 2 (PCV2) enteric disease: an independent condition or part of the systemic disease? *Veterinary Microbiology*, v. 176, n. 1, p. 83-87, 2015.

BLANCHARD, P.; MAHE, P.; CARIOLET, R. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV-2) proteins. *Vaccine*, v. 21, n. 31, p. 4565-4575, 2003.

BRUNBORG, I.M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C.M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 122, n. 2, p. 171-178, 2004.

BRUNBORG, I.M.; FOSSUM, C.; LIUM, B.; BLOMQVIST, G.; MERLOT, E.; JORGENSEN, A.; ELIASSON-SELLING, L.; RIMSTAD, E.; JONASSEN, C.M.; WALLGREN, P. Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 52, n. 22, p. 1-10, 2010.

CAPRIOLI, A.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; LAGAN-TREGASKIS, P.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; McKILLEN, J.; OSTANELLO, F.; ALLAN, G. PCR detection of experimentally infected pigs. *Veterinary Science*, v. 81, n. 2, p. 287-292, 2006.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; SOARES R.M.; BERSANO J.G.; MORENO A.M.; RUIZ, V.L.A.; VILLALOBOS E.M.C.; DOTO, D.S.; RICHTZENHAIN, L.J. Partial sequencing of Open Reading Frame-2 (ORF-2) of Brazilian Porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Virus Reviews and Research*, v.7, p.81, 2003.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; BRANDÃO, P.; RICHTZENHAIN, L.J. Circovírus Suíno tipo 2: Artigo de revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 74, n. 3, p. 281-291, 2007.

CHARREYRE, C.; BÉSÈME, S.; BRUN, A.; BUBLOT, M.; LAPOSTOLLE, B.; SIERRA, P.; VAGANAY, A. Protection of piglets against a PCV-2 experimental challenge by vaccinating gilts with inactivated adjuvanted PCV-2 vaccine, Circovac®: Serological, Clinical and Pathological Aspects. *In: Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark, vol. 1, 2006.

CHEN, G.; TANG, X.; SUN, Y.; ZHOU, L.; LI, D.; BAI, Y.; MAI, K.; LI, Y.; WU, Q.; MA, J. Development of a SYBR green –based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs. *Journal of Virological Methods*, v. 251 (January), p.129-132, 2018.

CHEN N.; HUANG, Y.; YE, M.; LI, S.; XIAO, Y.; CUI, B.; ZHU, J. Co-infection status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) in eight regions of China from 2016 to 2018. *Infections, Genetics and Evolution*, v. 68, p. 127-135, 2019.

CHEUNG, A.K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, v. 313, n. 2, p. 452-459, 2003.

_____, Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Research*, v. 164, n. 1-2, p. 46-53, 2012.

_____, LAGER, K.M.; KOHUTYUK, O.I.; VINCENT, A.L.; HENRY, S.C.; BAKER, R.B.; ROWLAND, R.R.; DUNHAM, A.G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds, *Archives of Virology*, v. 152, n. 5, p. 1035-1044, 2007.

CHIARELLI-NETO, O.; CASTRO, L.A.; SILVA, F.M.F.; BONFÁ, G.; SILV, A.J.; MORAES, M.P.; ALMEIDA, M.R. Identificação do Circovírus suíno tipo 2 em animais no centro norte do estado do Espírito Santo. UFV/XV SIC/MARÇO-2006/ Bioquímica e Biologia Molecular/ 685, 2006.

_____, YOTOKO, K.S.; VIDIGAL, P.M.; SILVA, F.M.; CASTRO, L.A.; FIETTO, J.L.; SILVA, A.J.R.; ALMEIDA, M.R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Research*, v. 140, n. 1-2, p. 57-63, 2009

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 circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 66, n. 4, p. 217-224, 2002.

CHOI, C.Y.; CHOI, Y.C.; PARK, I.B.; LEE, C.H.; KANG, S.J.; CHUN, T. The ORF5 protein of porcine circovirus type 2 enhances viral replication by dampening type I interferon expression in porcine epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, v. 226 (November), p. 50-58, 2018.

CIACCI-ZANELLA, J.R. *Circoviridae*. *In*: FLORES, E. (Org.) Virologia Veterinária. Santa Maria: Editora UFSM, p. 363-374, 2007.

_____, *Situação atual da circovirose no Brasil*. Palestra proferida no XVIII Congresso da ABRAVES, 2017 – A Suinocultura Brasileira na Era da Tecnologia e da Sustentabilidade, Goiânia, GO. Disponível em www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1081769/1/final8668.pdf

_____, MORÉS, N. Diagnóstico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovírus Suíno tipo 2. Comunicado Técnico, EMBRAPA-CNPSA, 270, 3p., 2001.

_____, MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imuno-histoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.

CIB – ver Conselho de Informações sobre Biotecnologia.

CLARK, E.G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *In*: *Proceedings of American Association of Swine Practitioners*, Quebec City, Canada, March, v. 28, p. 499-501, 1997.

Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Vacina contra circovirose suína chega ao Brasil. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/controle-de-circovirose-suina-ja-pode-ser-feito-com-vacina-segura_58678.html Acesso em: 07 out 2019.

CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Low levels of diversity among genomes of Porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between Porcine circoviruses. *Virology*, v. 422, n. 2, p. 161-164, 2012.

_____, GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Letter to the Editor: Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotype definition and nomenclature. *Veterinary Microbiology*, v. 149, n. 3-4, p. 522-523, 2011a.

_____, PILERI, E.; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; BALASCH, M.; PLANA, J.; SEGALÉS, J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *The Veterinary Journal*, v. 187, n. 3, p. 363-368, 2011b.

COSTA, A.N. Produção e bem-estar animal: Aspectos técnicos e éticos da produção intensiva de suínos. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11 (supl. 1), p. 43-48, 2008.

CRUZ, A.C.M.; SILVEIRA, R.L.; BAEZ, C.F.; VARELLA. R.B.; CASTRO. T.X. Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 195 (November), p. 154-157, 2016.

DAVIES, B.; WANG, X.; DVORAK, C.; MARTHALER, D.; MURTAUGH, M. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Research*, v. 217, n. 2, p. 32-37, 2016.

DENG, J.; LI, X.; ZHENG, D.; WANG, Y.; CHEN, L.; SONG, H.; WANG, T.; HUANG, Y.; PANG, W.; TIAN, K. Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3. *Archives of Virology*, v. 163, n. 2, p. 479-482, 2018.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A., HOLMES, E.C. Rates of evolutionary changes in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, n. 4, p. 267-276, 2008.

DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BAEKBO, P.; LARSEN, L. E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 1-2, p. 56–64, 2008.

EMBRAPA – ver Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Estatísticas/Desempenho da produção.* Disponível em https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas Acesso em 09 nov 2019.

FACCINI, S.; BARBIERI, I.; GILIOLI, A.; SALA, G.; GIBELLI, L.R.; MORENO, A.; SACCHI, C.; ROSIGNOLI, C.; FRANZINI, G.; NIGRELLI, A. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n. 6, p. 1661-1664, 2017.

FAIM, L. Atualização Circovírus: Homologia/Identidade dos diferentes genótipos circulantes. Disponível em: www.ourofinosaudeanimal.com Acesso em: 07 out 2019.

FAUREZ, F.; DORY, D.; GRASLAND, B.; JESTIN, A. Replication of porcine circoviruses. *Virology Journal*, v.6, p. 60-68, 2009. doi:10.1186/1743-422X-6-60

FIGUERAS-GOURGUES, S.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J.; HERNÁNDEZ-CARAVACA, I.; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A. GOMEZ-DURAN, O.; GROSSE-LIESNER, B. Effect of Porcine circovírus 2 (PCV-2) maternally derived antibodies on performance and PCV-2 viremia in vaccinated piglets under field conditions. *Porcine Health Management*, v. 5, n. 21, p. 1-11, 2019.

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

FIRTH, C.; CHARLESTON, M.A.; DUFFY, S.; SHAPIRO, B.; HOLMES, E.C. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, v. 83, n. 24, p. 12813-12821, 2009.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; MORÉS, N.; ZANELLA, J.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (Síndrome definhante multissistêmica de suínos desmamados) no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, n. 1, p. 39-53, 2005.

FRANZO, G.; SEGALÉS, J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *Plos One*, v. 13 (December), p. 12, 2018.

_____, CORTEY, M.; CASTRO, A.M.M.G.; PIOVEZAN, U.; SZABO, M.P.J.; DRIGO, M.; SEGALÉS, J.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic characterization of Porcine circovirus type 2 (PCV-2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV-2 evolution. *Veterinary Microbiology*, v. 178, n. 1-2, p.158-162, 2015a.

_____, TUCCIARONE, C.M.; DOTTO, G.; GIGLI, A.; CEGLIE, L.; DRIGO, M. International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 32 (June), p. 409-415, 2015b.

_____, CORTEY, M.; SEGALÉS, J.; HUGHES, J.; DRIGO, M. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 100 (July), p. 269-280, 2016.

_____, LEGNARDI, M., HJULSAGER, C.K., KLAUMANN, F., LARSEN, L.E., SEGALÉS, J., DRIGO, M. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 fields strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n. 3, p. 602-606, 2017.

_____, LEGNARDI, M.; CENTELLEGHE, C.; TUCCIARONE, C.M.; CECCHINATTO, M.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J.; DRIGO, M.. Development and validation of direct PCR and quantitative PCR assays for the rapid, sensitive, and economical detection of porcine circovirus 3. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 30, n. 4, p. 538-544, 2018a.

_____, TUCCIARONE, C.M.; DRIGO, M.; CECCHINATO, M.; MARTINI, M.; MONDIN, A.; MENANDRO, M.L. First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: high prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n.4, p. 1-7, 2018b.

FU, X.; FANG, B.; MA, J.; LIU, Y.; BU, D.; ZHOU, P.; WANG, H.; JIA, K.; ZHANG, G. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n. 2, p.296-303, 2018.

FUX, R.; SÖCKLER, C.; LINK, E.K.; RENKEN, C.; KREJCI, R.; SUTTER, G.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virology Journal*, v. 15, n. 25, p. 1-9, 2018.

GAO, Z.; DONG, Q.; JIANG, Y.; OPRIESSNIG, T.; WANG, J.; QUAN, Y.; YANG, Z. ORF-4 protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNA *in vitro*. *Virus Research*, v. 183 (April), p.56-62, 2014.

GERBER, P.F.; PINTO, F.F.; HEINEMANN, M.B.; LOBATO, Z.I.P. Detection and dynamics of porcine circovirus 2 shedding in semen using conventional and real-time PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v, 30, n. 11, p.918-920, 2010.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 1-2, p. 23-35, 2008.

_____, FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of disease caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, v. 187, n. 1, p. 23-32, 2011.

GRIERSON, S.S.; WERLING, D.; BIDEWELL, C.; WILLIAMSON, S. Characterization of porcine circovirus type 2 in porcine circovirus disease cases in England and Wales. *Veterinary Record*, v. 182, n. 1, p. 1-5, 2018.

GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.; MAIA, G.; LEMOS, M. ITO, M.; CUSTODIO, S. Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 45, p. 85-136, 2017. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream Acesso em: 07 de março de 2019.

GUO, Z.; LI, X.; DENG, R.; ZHANG, G. Detection and genetic characteristics of poricne circovírus 3 based on orla fluids from asymptomatic pigs in central China. *BMC Veterinary Research*, v.15, n. 1, p. 200-205, 2019.

HA, Z.; XIE, C.; LI, J.; WEN, S.; ZHANG, K.; NAN, F.; ZHANG, H.; GUO, Y.; WANG, W.; LU, H.; JIN, N. Molecular detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in pigs from Northeast China. *BMC Veterinary Research*, v. 14, p. 321- 327, 2018. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1634-6

HAMBERG, A.; RINGLER, S.; KRAKOWKA, S. A novel method for the detection of porcine circovirus type 2 replicative double stranded viral DNA and non replicative single stranded viral DNA in tissue sections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 19, n. 2, p. 135-141, 2007.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G.P. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 64, n. 1, p. 44-52, 1998.

HARDING, J.C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *In: Proceedings of Western Canadian Association of Swine Practitioners*, Saskatoon, Canada, October, p. 21, 1996.

_____, CLARK, E.G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health Production*, v.5, n. 5, pp. 201-203, 1997

_____, CLARK, E.G.; STROKAPPE, J.H.; WILLSON, P.I.; ELLIS, J.A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Journal of Swine Health and Production*, v. 6, n. 6, p. 249-254, 1998.

HARMON, K.M.; GAUGER, P.C.; ZHANG, J.; PIÑEYRO, P.E.; DUNN, D.D.; CHRISWELL, A.J. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus type 2 Viruses Detected in swine from Mexico and United States. *Genome Announcements*, v. 3, n. 6, p. 1-2, 2015.

HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.R.; LAGER, K.M.; MOROZOV, I.; PAUL, P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/DC pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*, v. 38, n. 5, p. 528-539, 2001.

HAYASHI, S.; OSHIMA, Y.; FURUYA, Y.; NAGAO, A.; OROKU, K.; TSUTSUMI, N.; SASAKAWA, C.; SATO, T. First detection of porcine circovirus type 3 in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science,* v.80, n. 9, p. 1468-1472, 2018.

HU, X.; TIAN, Z.; PENG, B.; CHEN, H.; QU, J. Complete nucleotide sequence of Porcine Circovirus 2 isolated from piglets in China. *Genome Announcements*, v. 1, n. 4, p.1, 2013.
IBGE – ver Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas Econômicas.

ICTV – ver International Committee on Taxonomy of Viruses.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas Econômicas, 2018. Disponível em www.ibge.gov.br/estatisticas Acesso em: 30 set 2019.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus Acesso em: 10 de março de 2019.

JACOBSEN, B.; KRUEGER, L.; SEELIGER, F.; BRUEGMANN, M.; SEGALÉS, J.; BAUMGAERTNER, W. Retrospective study on the ocorrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology*, v. 138, n. 1-2, p. 27-58, 2009.

JIANG, H.; WANG, D.; WANG, J.; ZHU, J.; SHE, R.; REN, X.; TIAN, J.; QUAN, R.; HOU, L.; LI, Z.; CHU, J.; GUO, Y.; XI, Y.; SONG, H.; YUAN, F.; WEI, L.; LIU, J. Induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in piglets by infection with porcine circovirus type 3. *Journal of Virology*, v. 93, n.4, p. 1–16, 2019.

KARUPPANNAN, A.K.; OPRIESSNIG, T. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. *Viruses,* v. 9, n. 5, p. 1-15, 2017.

KEDKOVID, R.; WOONWONG, Y.; ARUNORAT, J.; SIRISEREEWAN, C.; SANGPRATUM, N.; KESDANGSAKONWUT, S.; TUMMARUK, P.; TEANKUM, K.; ASSAVACHHEP, P.; JITTIMANEE, S.; THANAWONGNUWECH, R. Porcine circovirus type 3 (PCV3) shedding in sow colostrum. *Veterinary Microbiology*, v. 220 (July), p. 12-17, 2018.

KEKARAINEN, T.; LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology*, v. 68, n. 7, p. 966-971, 2007.

KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *Journal of Virological Methods*, v. 92, n. 2, p. 105-111, 2001.

_____, 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 Virology*, v. 98, n. 1, p. 25-31, 2001.

KIM, H.R.; PARK, Y.R.; LIM, D.R.; PARK, M.J.; PARK, J.Y.; KIM, S.H.; LEE, K.K.; LYOO, Y.S.; PARL, C. K. Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *Journal of Virological Methods*, v. 250 (December), p. 11-16, 2017.

KIM, S.C.; NASKI, S.; KWON, S.; JUHNG, J.H.; MUN, K.H.; JEON, D.Y.; JEONG, C.G.; KHATUN, A.; KANG, S.J.; KIM, W.I.. The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. *BMC Veterinary Research*, v.14, p. 294, 2018a.

_____, PARK, J.Y.; JUNG, J.Y.; KIM, H.Y.; PARK, Y.R.; LEE, K.K.; LYOO, Y.S.; YEO, S.G.; PARK, C.K. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea. *Journal of Veterinary Science*, v. 19, p. 721-724, 2018b.

KLAUMANN, F.; CORREA-FIZ, F.; FRANZO, G.; SIBILA, M.; NUNEZ, J.I.; SEGALÉS, J. Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, n.3, p. 1-13, 2018a.

_____, FRANZO, G.; SOHRMANN, M.; CORREA-FIZ, F.; DRIGO, M.; NUNEZ, J.I.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Retrospective detection of Porcine circovirus 3 (PCV3) in pig serum samples from Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n. 5, p. 1290-1296, 2018b.

_____, CORREA-FIZ, F.; SIBILA, M.; NÚÑEZ, J.I.; SEGALÉS, J. Infection dynamics of porcine circovírus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. *Veterinary Record*, v. 184, n. 20, http://dx.doi.org/10.1136/vr.105219, 2019a.

_____, DIAS-ALVES, A.; CABEZÓN, O.; MENTABERRE, G.; CASTILLO-CONTRERAS, R.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; CASAS-DIAZ, E.; SIBILA, M.; CORREA-FIZ, F.; SEGALÉS, J. Porcine Circovirus 3 (PCV-3) is highly prevalent in serum and tissues and may persistently infect wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 66, n.1, p. 91-101, 2019b.

_____, HE, W.; CORREA-FIZ, F.; LI, G.; LEGNARDI, M.; SU, S.; SEGALÉS, J. A shift in Porcine Circovirus 3 (PCV-3) history paradigm: phylodynamic analyses reveal as ancient origin and prolonged undetected circulation in the worldwide swine population. *Advanced Science*, https://doi.org/10.1002/advs.20191004, 2019.

KU, X.; CHEN, F.; LI, P.; WANG, Y.; YU, X.; FAN, S.; QIAN, P.; WU, M.; HE, Q. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n. 3, p. 703-708, 2017.

KWON, T.; YOO, S.J.; PARK, C.K.; LYOO, Y.S. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Veterinary Microbiology*, v. 207 (August), p. 178-180, 2017.

LI, G.; HE, W.; ZHU, H.; BI, Y.; WANG, R.; XING, G.; ZHANG, C.; ZHOU, J.; YUEN, K.; GAO, G.F.; SU, S. Origin, Genetic Diversity, and Evolutionary Dynamics of Novel Porcine Circovirus 3. *Advanced Science*, v. 5, n.9, p. 1-10, 2018.

LI, X.; BAI, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, D.; WANG, T.; WANG, Y.; DENG, J.; SUN, Z.; TIAN, K. Production of a monoclonal antibody against Porcine circovirus type 3 cap protein. *Journal of Virological Methods*, v. 261 (November), p. 10-13, 2018a.

_____, QIAO, M.; SUN, M.; TIAN, K. A duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of porcine circovirus 2 and 3. *Virologica Sinica*, v. 33, n. 2, p. 181-186, 2018b.

LIU, J.; ZHU, Y.; CHEN, I.; LAU, J.; WANG, Z.; KARUPPANNAN, A.K.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *Journal of Virology*, v. 81, n. 17, p. 9560-9567, 2007.

LÓPEZ-LORENZO, G.; DÍAZ-CAO, J.M.; PRIETO, A.; LÓPEZ-NOVO, C.; LÓPEZ, C.M.; DÍAZ, P.; RODRÍGUEZ-VEJA, V.; DÍEZ-BAÑOS, P.; FERNÁNDEZ, G. Environmental distribution of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. *Scientific Reports*, https://doi.org/10.1038/s41598-019-51473-6 , 2019.

LÓPEZ-SORIA, S.; SIBILA, M.; NOFRARÍAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; MANZANILLA, E.G.; RAMÍREZ-MENDOZA, H.; MINGUEZ, A.; SERRANO, J.M.; MARÍN, O.; JOISEL, F.; CHARREYRE, C.; SEGALÉS. J. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Veterinary Microbiology*, v.174, n. 3-4, p.1 296-301, 2014.

LORENZ, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, v. 63, 2012. https://doi:10.3791/3998

LU, S.; LI, X.; CALDERONE, R.; ZHANG, J.; MA, J.; CAI, W.; XI, L. Whole blood Nested PCR and Real-time PCR amplification of Talaromyces marneffei specific DNA for diagnosis. *Medical Mycology*, v.54, n. 2, p.162-168, 2016.

LYOO, K.S.; PARK, Y.H.; PARK, B.K.L Prevalence of porcine reproductive an respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *Journal of Veterinary Science*, v. 2, n. 3, p. 201-207, 2001.

_____, JOO, H.S.; DAVIES, P.R.; HAN, J.H. Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in light and heavy pigs of market age on farms with routine PCV2 vaccination. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 76, n.3, p. 221-223, 2012.

MACHADO, B.C.; VIEIRA, H.R.; ALVES, M.R.M.; CARMONA, R.C.C. Evaluation of a real-time PCR assay performance for the diagnosis of enteroviral meningitis. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 75, p. 1-6, 2016.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, v. 63, n. 3, p. 223-233, 2000.

MAES, D.; LARRIESTRA, A.; DEEN, J.; MORRISON, R. A retrospective study of mortality in grow-finish pigs a multi-site production system. *Journal of Swine Health and Production*, v. 9, n. 6, p. 267-273, 2001.

MARTINEZ, E.Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B.B. A curva ROC para testes diagnósticos. *Caderno Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p. 7-31, 2003.

MARTINÉZ-GUINÓ, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology*, v. 71, p. 1390-1395, 2009.

MARTINS, CÁTIA ANDREIA PEREIRA MARTINS. Quantificação de DNA por PCR em Tempo Real em diferentes Amostras Forenses, Dissertação de mestrado apresentada à Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Forenses, 94p, Porto, 2016.

MDIC – ver Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços.

MEEHAN, B.M.; McNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHURST, V.A.; ELLIS, J.A.; HASSARD, L.E.; CLARK, E.G.; HAINES, D.M.; ALLAN, G.M. Characterization of novel circovírus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, n. 79, n. 9, p. 2171-2179, 1998.

Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Séries Históricas. Disponível em www.mdic.gov.br/index.php/comercio-exterior. Acesso em: 30 set 2019.

MISINZO,G.; MEERTS, P.; BUBLOT, M.; MAST, J.; WEINGARTL, H.M.; NAUWYNCK, H.J. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *Journal General of Virology*, v. 86, n. 7, p. 2057-2068, 2005.

MONROY, M.A.R.; RAMIREZ-NIETO, G.C.; VERA, V.J.; CORREA, J.J.; MOGOLLÓN-GALVIS, J.D. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with Porcine Circovirus Associated Diseases in Colombia. *Virology Journal*, v. 11, n. 143, p. 1-11, 2014. http://www.virologyj.com/content/11/1/143

MORAES, J.H.C. Relatório EMATER 2013. Comunicação pessoal recebida por email: menezescruz@gmail.com em 26 jun 2014.

MORANDI, F.; PANARESE, S.; VERIN, R.; OSTANELLO, F.; BENAZZI, C.; SARLI, G. PCV2-DNA in formalin-fixed and paraffin embedded lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa* ssp. *Scrofa*): one sampling approach for two laboratory techniques. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 54, n.17, p. 1-3, 2012.

NAUWYNCK, H.J.; SANCHEZ, R.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D.J.; SAHA, D.; HUANG, L.; MISINZO, G. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Research*, v. 164, n. 1-2, p. 43-45, 2012.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, P.A.; SORDE, S.D.; PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *The Journal of General Virology*, v. 81, n. 9, p. 2281-2287, 2000.

NIELSEN, G.B.; NIELSEN, J.P.; HAUGEGAARD, J.; LETH, S.C.; LARSEN, L.E.; KRISTENSEN, C.S.; PEDERSEN, K.S.; STEGE, H.; HJULSAGER, C.K.; HOUE, H. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection pf porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porcine Health Management*, v.4, n. 2, p. 1-10, 2018.

OLIVEIRA FILHO, J.X.; CHITARRA, C.S.; DE PAULA, D.A.J.; GODOY, I.; SILVA, M.C.; COLODEL, E.M.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. Ocorrência de *Circovírus suíno* tipo 2 em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 4, p. 363-366, 2009.

OLIVER-FERRANDO, S.; SEGALÉS, J.; LÓPEZ-SORIA, S.; CALLÉN, A.; MERDY, O.; JOISEL, F.; SIBILA, M. Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages. *Veterinary Research*, v. 47, n. 121, p. 2-11, 2016

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in sérum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*, v. 117, n. 1, p. 75-80, 2004.

_____, CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*, v. 357, n. 2, p. 175-185, 2007.

OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research*, v. 164, n. 1-2, p. 20-32, 2012.

_____, MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, an intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; XIAO, C.T.; GERBER, P.F.; HALBUR, P.G.; MATZINGER, S.R.; MENG, X.J. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV-2) exhibits similar virulence to the classical PCV-2a and PCV-2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *Journal of General Virology*, v. 95, n. 11, p. 2495-2503, 2014.

OUYANG, T., NIU, G., LIU, X., ZHANG, X., ZHANG, Y. REN, L. Recent progress on porcine circovirus type 3. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 73, p. 227-233, 2019a.

_____, ZHANG, X., LIU, X., REN, L. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*, v.11, n.2, p. 185-199, 2019b.

PALINSKI, R.; PIÑEYRO, P.; SHANG, P.; YUAN, F.; GUO, R.; FANG, Y.; BYERS, E.; HAUSE, B.M. A novel porcine Circovirus distantly related to known circoviruses is associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and reproductive failure. *Journal of Virology*, v. 91, n. 1, p. 1-13, 2016.

PELLIZA, B.R.; CARRANZA, A.I.; Di COLA, G.; AMBROGI, A. Monitoramento das patologias em suínos no período de crescimento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 614-620, 2007.

PEREDA, A.; PINEYRO, P.; BRATANICH, A.; QUIROGA, M.A.; BUCAFUSCO, D.; CRAIG, M.I.; CAPPUCCIO, J.; MACHUCA, M.; RIMONDI, A.; DIBARBOSA, M.; SANGUINETTI, H.R.; PERFUMO, C.J. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs with porcine circovirus associated diseases in Argentina. *Veterinary Science*, Article ID 560906, 6p, 2011.

PÉREZ-MARTÍN, E.; ROVIRA, A.; CALSAMIGLIA, M.; MANKERTZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; SEGALÉS, J. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed paraffin-embedded swine tissues. *Journal of Virology Methods*, v. 146, n. 1-2, p. 86-95, 2007.

PESCADOR, C.; BANDARRA, P.; CASTRO, L.; ANTONIASSI, N. A. B.; RAVAZZOLO, A. P.; SONNE, L.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27 n. 10, p. 425-429, 2007.

PHAN, T.G.; GIANNITTI, F.; ROSSOW, S.; MARTHALER, D.; KNUTSON, T.; LI, L.; DENG, X.; RESENDE, T.; VANNUCCI, F.; DELWART, E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal*, v. 13, n. 184, p. 1-8. 2016.

PINTO F.F.; LOBATO Z.I.P.; NASCIMENTO E.F.; ROCHA M.A.; BARBOSA C.N. Influência do processamento tecidual na detecção do circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) utilizando a técnica de PCR. Anais 11º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Goiânia. Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, p.103-104, 2003.

_____, GERBER, P.F.; OLIVEIRA, T.M.L.; BORGES, I.A.; LOBATO, Z.I.P. Perfil sorológico, viremia e eliminação do circovírus suíno tipo 2 em animais naturalmente infectados pertencentes a granjas com ou sem a síndrome da refugagem multissistêmica. *Pesquisa Veterinária Brasileira,* v. 31, n. 1, p. 17-22 , 2011.

_____. Padronização e aplicação da técnica de PCR "Nested" no diagnóstico do circovírus suíno tipo II em tecidos. Dissertação (Medicina Veterinária – Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 61p. 2004.

PONTES, Nayara Evaristo de. *Estudos Moleculares Aplicados ao Circovírus suíno tipo 2: Desenvolvimento da técnica de Nested-PCR em tubo único (STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco.* Dissertação (Ciências Biológicas – Área de concentração Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 66p. 2014.

PORK ORG, 2018. Disponível em: https://www.pork.org/facts/stats/u-s-pork-exports/world-per-capita-pork-consumption/ Acesso em: 30 set 2019.

QI, S.; SU, M.; GUUO, D.; LI, C.; WEI, S.; FENG, L.; SUN, D. Molecular detection and phylogenetic analysis of porcine circovírus type 3 in 21 provinces of China during 2015-2017. *Transboundary and merging Diseases*, v. 66, n. 2, p.1004-1015, 2019.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARROJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGOS, M. Clinical and pathological observations of pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Research*, v. 149, p. 357-361, 2001.

RAMOS, N.; MIRAZO, S.; CASTRO, G.; ARBIZA, J. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from piglets with exudative epidermitis in Uruguay. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 2, p. 1042-1045, 2012.

REINER, G.; HOFMEISTER, R.; WILLEMS, H. Genetic variability of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolates from vaccinated and non-vaccinated pig herds in Germany. *Veterinary Microbiology*, v. 180, n. 1-2, p. 41-48, 2015.

ROCHA, D.L.; ALBERTON, G.C.; SANTOS, J.L. Identificação do Circovírus suíno tipo 2 e do Parvovírus suíno em fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de granjas no Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 3, p. 600-606, 2010.

RODRIGUES, Ingrid Lyrio Figueira. *Caracterização molecular e estudo evolutivo do circovírus suíno tipos 2 e 3 em amostras de órgãos suínos no período e 1967 a 2018*. Qualificação de Doutorado (Área de concentração Virologia), Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 103p, 2019.

ROVIRA, A.; BALASH, M.; SEGALÉS, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURÁN, J.; ROSSEL, C.; ELLERBROK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, v. 76, n. 7, p. 3232-3239, 2002.

ROYER, R.L.; NAWAGITGUL, P.; HALBUR, P.G.; PAUL, P.S. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production*, v. 9, n. 6, p. 281-284, 2001.

RUIZ, A.; GUTIERREZ, C.; RAMIREZ, E.; QUEZADA, M.; LECOCQ, C.; SEGALÉS, J. Postweaning multisystemic wasting syndrome in Chile. *Veterinary Record*, v. 14, n. 161, p. 496, 2007.

SAPORITI, V.; CRUZ, T.F.; CORREA-FIZ, F.; NUÑEZ J.I.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Similar frequency of *Porcine circovírus* 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs affected by digestive or respiratory disorders and age-matched clinically healthy pigs. *Transboundary and Emerging Disease*, on line version, 2019. https://doi.org/10.1111/tbed.13341

SARAIVA, G.L.; VIDIGAL, P.M.P.; FIETTO, J.L.R.; BRESSAN, J.C.; SILVA JUNIOR, A.; ALMEIDA, M.R. Evolutionary analysis of porcine circovirus type 3 (PCV3) indicates an ancient origin for its current strains and a worldwide dispersion. *Virus Gene*, v. 54, n. 3, p. 376-384, 2018.

_____, VIDIGAL, P.M.P.; ASSAO, V.S.; FAJARDO, M.L.M.; LORETO, A.N.S.; FIETTO, J.L.R.; BRESSAN, G.C.; LOBATO, Z.I.P.; ALMEIDA, M.R.; SILVA-JUNIOR, A. Retrospective detection and genetic characterization of porcine circovírus 3 (PCV3) strains identified between 2006 and 2007 in Brazil. *Viruses*, v.11, n.2. p. 201-212, 2019.

SARRADELL, J.; PEREZ, A.M.; ANDRADA, M.; RODRIGUEZ, F.; FERNANDEZ, A.; SEGALÉS, J. PMWS in Argentina. *Veterinary Record*, v. 10, n. 150, p. 323, 2002.

SEDLACKOVA, T.; REPISKA, G.; CELEC, P.; SZEMES, T.; MINARIK, G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*, v.15, n. 5, 2013. http://www.biologicalproceduresonline.com/content/15/1/5

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, v. 164, n. 1-2, p. 10-19, 2012.

_____. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n. 3, p. 473-487, 2015.

_____; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, v. 24, n. 3, p. 109-124, 2002.

_____; KEKARAINEN, T.; CORTEY, M. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Veterinary Microbiology*, v. 165, n. 1-2, p. 13-20, 2013.

_____; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, v. 111, n. 3-4, p. 223-229, 2005.

_____; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record*, v. 162, n. 26, p. 867-868, 2008.

SHEN, H.; WANG, C.; MADSON, D.M.; OPRIESSNIG, T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 97, n. 3-4, p. 228-236, 2010.

_____; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *Journal of General Virology*, v. 93, n. 6, p. 1345-1355, 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 Medicine* B, v. 65, n. 3, p. 405-408, 2003.

SILVA, F.M.F.; SILVA JR, A.; PETERNELLI, E.F.O.; VIANA, V.W.; CHIARELLI NETO, O.; FIETTO, J.L.R.; VARGAS, M.IZ.; NERO, L.A.; ALMEIDA, M.R. Retrospective study on *Porcine circovirus-2* by nested PCR and real time PCR in archived tissues from 1978 in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n.3, pp. 1156-1160, 2011.

SOARES, P.; SALES, T.P.; DOM, H.R.; SILVA, D.A.; APOLLA, G.; CASTRO, M.C.; ELSNER, W.M.; BRITO, D. Manifestações clínicas associadas ao complex circovirose suína no estado de Goiás – Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 5, n. 1, p. 13-18, 2011.

.

SORDEN, S.D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Swine Health and Production*, v. 8, v. 3, p. 133-136, 2000.

SOUZA, Amanda Eduarda de. *Detecção molecular do Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), Torque teno vírus suíno 1 e 2 (TTSuV1 e TTSuVk2) e achados histopatológicos em órgãos de*

suínos submetidos ao abate regular no estado do Espírito Santo. Dissertação de Mestrado, (Área de concentração Virologia), Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 64p, 2018.

SOUZA, N.N.; LOBATO, Z.I.P.; GUEDES, R.M.C. Estudo retrospectivo de diagnósticos de circovirose suína pela técnica de imunohistoquímica. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n. 4, p. 521-525, 2008.

STADEJEK, T.; WOZNIAK, A.; MITEK, D.; BIERNACKA, K. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transboundary and Emerging Diseases.* v. 64, n. 5, p. 1350-1353, 2017.

STATISTA, 2018. Disponível em: https://www.statista.com/statistics/1025784/human-consumption-of-protein-by-type-worldwide/ Acesso em 09 nov 2019

STEINFELDT, T.; FINSTERBUSH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep' Protein of Porcine circovirus type 1 Bind to the Origin of Replication in Vitro. *Virology,* v. 291, n. 1, p. 152-160, 2001.

SUKMAK, M.; THANANTONG, N.; POOLPERM, P.; BOONSOONGNERN, A.; RATANAVANICHROJN, N.; JIRAWATTANAPONG, P.; WOONWONG, Y.; SODA, N.; KAMINSONSAKUL, T.; PHUTTAPATIMOK, S.; WAJJWALKU, W. The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 66, n.1, p. 611-616, 2019.

SUN, J.; WEI, L.; LU, Z.; MI, S.; BAO, F.; GUO, H.; TU, C.; ZHU, Y.; GONG, W. Retrospective study of porcine circovirus 3 infection in China. *Transboundary and Emerging Diseases.* v. 65, n. 3, p. 607-613, 2018.

TAKAHAGI, Y.; NISHIYAMA, Y.; TOKI, S.; YONEKITA, T.; MORIMATSU, F.; MURAKAMI, H. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pigs farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 70, n. 6, p. 603-606, 2008.

TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I.M.; WIKSTROM, F.H.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; McMENAMY, M.; McNEILLY, F.; FUXLER, L.; BELAK, K.; PODERSOO, D.; SAAT, T.; BERG, M.; FOSSUM, C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Gene*, v. 36, n. 3, p. 509-520, 2008.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus - and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt für Bakteriologie*, v. 226, n. 2, p. 153-167, 1974.

_____; GLEDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature*, v. 295, n. 5844, p. 64–66, 1982.

_____; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, v. 91, n. 3-4, p. 271-276, 1986.

_____; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology*, v. 96, n. 1-2, p. 39-57, 1987.

THANGTHAMNIYOM, N.; SANGTHONG, P.; POOLPERM, P.; THANANTONG, N.; BOONSOONGNERN, A.; HANSOONGNERN, P.; SEMKUM, P.; PETCHARAT, N.; LEKCHAROENSUK, P. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in Thailand during 2009-2015. *Veterinary Microbiology*, v. 208 (September), p. 239-246, 2017.

THOMSON, J.R.; WILLIAMS, R.A.; DICK, J.D.; SUMPTION, K. Current and future PCR diagnostic technology for pig diseases. *Pig Journal*, v. 46 (November), p.142-149, 2000.

TOCHETTO, C.; LIMA, D.A.; VARELA, A.P.M.; LOIKO, M.R.; PAIN, W.P.; SCHEFFER, C.M.; HERPICH, J.I.; CERVA, C.; SCHMITD, C.; CIBULSKI, S.P.; SANTOS, A.C.; MAYER, E.Q.; ROEHE, P.M. Full-genome sequence of porcine circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. v. 65, n. 1, p. 5-9, 2018.

TRIBLE, B.R.; ROWLAND, R.R.R. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research*, v. 164, n. 1-2, p. 68-77, 2012.

TSAI, G.T.; LIN, Y.C.; LIN, W.H.; LIN, J.H.; CHIOU, M.T.; LIU, H.F.; LIN, C.N. Phylogeographic and genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan from 2001-2017. *Scientific Reports*, v.9, 2019. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47209-1

VARGAS-BERMUDEZ, D.S.; CAMPOS, F.S.; BONIL, L.; MOGOLOON, D. JAIME, J. First detection of Porcine circovirus type 3 in Colombia and the complete genome sequence demonstrates the circulation of PCV3a1 and PCV3a2. *Veterinary Medicine and Science*, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2019.

VIDIGAL, P.M.P.; MAFRA, C.L.; SILVA, F.M.F.; FIETTO, J.L.R.; JUNIOR, A.S.; ALMEIDA, M.R. Tripping over emerging pathogens around the world: A phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Research*, v. 163, n. 1, p. 320-327, 2012.

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

XIAO, C.T.; HARMON, K.M.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, Y. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016. *Veterinary Microbiology*, v. 197, p. 72-77, 2016.

WANG, F.; GUO, X.; GE, X.; WANG, Z.; CHEN, Y.; CHA, Z.; YANG, H. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Research*, v. 145, n. 1, p. 151-156, 2009.

WANG, W.; SUN, W.; CAO, L.; ZHENG, M.; ZHU, Y.; LI, W.; LIU, C.; ZHUANG, X.; XING, J.; LU, H.; LUO, T.; JIN, N. An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in cattle in Shandong province, China. *BMC Veterinary Research*, V. 15 (February), p. 60-67, 2019.

WEN, S.; SUN, W.; LI, Z.; ZHUANG, X.; ZHAO, G.; XIE, C.; ZHENG, M.; JING, J.; XIAO, P.; WANG, M.; HAN, J.; REN, J.; LIU, H.; LU, H.; JIN, N. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 65, n. 1, p. 27-31, 2018.

YANG, X.; CHEN, F.; CAO, Y.; PANG, D.; OUYANG, H.; REN, L. Complete genome sequence of porcine circovirus 2b strain CC1. *Journal of Virology*, v. 86, n. 17, p. 95-96, 2012.

YE, X.; BERG, N.; FOSSUM, C.; WALLGREN, P.; BLOMSTROM, A. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus Genes*, v. 54, n. 4, p. 466-469, 2018.

YOUNG, M.G.; CUNNINGHAM, G.L.; SANFORD, S.E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine corcovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production*, v. 19, n. 3, p. 175-180, 2011.

YUAN, W.; LI, J.; LI, L.; SUN, M.; ZHENG, Y.; QI, Y.; SUN, J.; SONG, Q. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by TaqMan based Real-time polymerase chain reaction assays. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 12, n. 3, p. 214-220, 2014.

ZHAI, S.L.; ZHOU, X.; ZHANG, H.; HAUSE, B.M.; LIN, T.; LIU, R.; CHEN, Q.L.; WEI, W.K.; LV, D.H.; WEN, X.H.; LI, F.; WANG, D. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virology Journal*, v. 14 (November), p. 222-228, 2017.

ZHAN, Y.; WANG, D.L.; WANG, N.D.; JIANG, Y.; HUANG, K.; CUI, S.J.; YANG, Y. Survey on detection and analyses of cap antigenicity prediction of porcine circovirus type 3 isolated from partial provinces of southern China. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, v. 48, pp. 1076-1084, 2017

ZHANG, J.; LIU, Z.; ZOU, Y.; ZHANG, N.; UANG, D.; TU, D.; YANG, L.; DENG, Z.; YANG, Y.; JIANG, P.; WANG, N. First molecular detection of porcine circovirus type 3 in dogs in China. *Virus Genes*, v. 54, n. 1, p. 140-144, 2017.

ZHANG, S.; WANG, D.; JIANG, Y.; LI, Z.; ZOU, Y.; LI, M.; YU, H.; HUANG, K.; YANG, Y.; WANG, N. Development and application of a baculovirus-expressed capsid protein-based indirect ELISA for detection of porcine circovirus 3 IgG antibodies. *BMC Veterinary Research*, 15, 79, 2019.

ZHENG, S.; WU, X.; ZHANG, L.; XIN, C.; LIU, Y.; SHI, J.; PENG, Z.; XU, S.; FU, F.; YU, J.; SUN, W.; XU, S.; LI, J.; WANG, J. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n. 5, p. 1337-1341, 2018a.

_____; SHI, J.; WU, X.; PENG, Z.; XIN, C.; ZHANG, L.; LIU, Y.; GAO, M.; XU, S.; HAN, H.; YU, J.; SUN, W.; CONG, X.; LI, J.; WANG, J. Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 64, n.1, pp. 1- 4, 2018b.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Acta Scientiae Veterinariae*, n. 36, supl. 1, p. 81-86, 2008.

ZOU, Y.; ZHANG, N.; ZHANG, J.; ZHANG, S.; JIANG, Y.; WANG, D.; TAN, Q.; YANG, Y.; WANG, N. Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan, China. *Archives Virology* v.163, n. 11, p. 2841-2847, 2018.

9 ANEXO

9.1 ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal Fluminense

ceua
Comitê de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Determinação da carga viral do circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), detecção molecular e sequenciamento do circovírus suíno tipo 3 (PCV-3) em amostras de soro coletadas em suínos", protocolada sob o CEUA nº 2491130718 (ID 000260), sob a responsabilidade de **Ana Cláudia de Menezes Cruz** *e equipe; TATIANA XAVIER DE CASTRO; Renato Luiz Silveira ; Ingrid Lyrio Figueira Rodrigues ; Amanda Eduarda de Souza* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 11/10/2018.

We certify that the proposal "Determination of porcine circovirus type 2 viral load (PCV-2), molecular detection and sequencing of porcine circovirus type 3 (PCV-3) in serum samples collected from pigs", utilizing 140 Swines (males and females), protocol number CEUA 2491130718 (ID 000260), under the responsibility of **Ana Cláudia de Menezes Cruz** *and team; TATIANA XAVIER DE CASTRO; Renato Luiz Silveira ; Ingrid Lyrio Figueira Rodrigues ; Amanda Eduarda de Souza* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 10/11/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 12/2019 Área: Microbiologia

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Suínos	sexo:	Machos e Fêmeas	Idade:	20 a 150 dias	N:	140
Linhagem:	Mista			Peso:	20 a 160 kg		

Local do experimento: Laboratório de Virologia Animal do Instituto Biomédico, UFF

Niteroi, 12 de março de 2019

Profa. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Dr. Fabio Otero Ascoli
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

9.2 ANEXO 2 – Artigo submetido ao Brazilian Journal of Microbiology.

Original Article

Molecular detection and quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in serum from pigs in Brazil

A.C.M. Cruz [a, *], I.L.F. Rodrigues [a], A.E. Souza [a], F.B. Knackfuss [b], G.N. Souza [c, d], R.L. Silveira [a, e], T.X. Castro [a].

[a] *Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, UFF, Niterói, RJ;*
[b] *Unigranrio, Duque de Caxias, RJ;*
[c] *EMBRAPA DAIRY CATLLE, RJ;*
[d] *Programa de Pós-graduação em Clínica e Reprodução Animal, UFF, Niterói, RJ.*
[e] *Deparamento de Morfologia, UFF, Niterói, RJ;*

* Corresponding author. Tel +55 21 99926-3145
E-mail address: menezescruz@gmail.com (A.C.M. Cruz)

Abstract

The aims of this study were to perform a molecular detection and quantification of PCV-2 with two different PCR assays in serum samples. In addition, the association between PCV-2 serum load and the epidemiological and clinical data of the animals was analyzed. For this, we conducted a study involving 149 animals from 36 herds located in the State of Rio de Janeiro and State of Espirito Santo. The pigs were classified into nursery, growth, and finishing groups according to their production phases, and separated into categories according to the clinical signs presented: asymptomatic, with respiratory signs, with diarrhea, and with multiple signs (arthritis, cough, and diarrhea). DNA was extracted from serum samples and submitted to a nested polymerase chain reaction (nested-PCR) and a real-time PCR (qPCR), both based on the PCV-2 open reading frame 2 (ORF2) region. Comparison of the two methods (nested and qPCR) revealed an overall agreement between the results in 65% of cases and the concordance was 73.15%. A significant ($P<0.05$) difference in the PCV-2 DNA viral load in serum was detected between pigs with and without clinical signs. No statistically significant difference was observed between the viral loads at different stages of production. The results suggest that pig serum is a viable clinical sample to monitor PCV-2 infections by molecular techniques, and real-time PCR was shown to be a useful diagnostic tool that could be used for both PCV-2 detection and viral load quantification, enabling the rapid adoption of herd prevention measures.

Keywords: swine; quantitative PCR; viral load; nested PCR

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is one of the most important viruses that mainly affects nursery and growing-finishing pigs. It causes different conditions depending on the variant, host immunity, co-infections, and other environment characteristics[1]. It rapidly became a significant cause of economic loss in the pig industry due to the costs relating to interventions for treatment and prevention[2]. Following its initial emergence and spread, the clinical presentations of PCV2 (PCV2-SD) include wasting or weight loss, pallor of the skin, respiratory distress, diarrhea, and occasionally, icterus[3]. However, porcine circovirus subclinical infection (PCV2-SI) is the most common form of PCV-2 manifestation, presenting a decreased average daily gain without any evident clinical signs[2,3].

As a complex disease with diverse clinical signs, the accurate diagnosis of PCV2 infections is very important in order to implement appropriate interventions in affected herds [4]. According to Segalés (3), a formal PCV2-SD diagnosis at the farm level should be based on two elements: (1) a significant increase in post-weaning mortality associated with the presentation of compatible clinical signs; and (2) the presence of clinical signs, compatible histopathological lesions, and the presence of viral DNA in at least 1 of 3 to 5 necropsied pigs. However, recently Cruz *et al*.(5), using molecular methods, diagnosed PCV-2 infection based on the presence of PCV2 DNA in serum.

The aims of this study were to perform a molecular diagnosis and quantification of PCV-2 using two different PCR assays (conventional PCR and real-time PCR) in serum samples from pigs with and without clinical signs in order to evaluate the use of qPCR as a diagnostic tool. In addition, the association between PCV-2 load and the epidemiological and clinical data of the animals was analyzed.

Material and methods

Between 2013 and 2018, a study was carried out involving 149 animals from 36 herds located in the State of Rio de Janeiro and in the State of Espirito Santo, Brazil.. The pigs were classified into three categories according to their production phase: nursery (3–10 weeks), growth (11–15 weeks), and finishing (≥ 16 weeks), and then weighed. The same veterinarian performed the clinical examination prior to blood collection and all data were recorded for further analysis. During the sample collection, 84 animals had clinical signs compatible with PCV-2, whereas 65 had no clinical symptoms. Therefore, the animals were separated into three categories according to the clinical signs presented: animals with diarrhea, animals with respiratory signs (cough, sneeze and secretion), and animals with multiple signs (arthritis, cough, and diarrhea) as described by Cruz *et al.* (5). The PCV-2 vaccine was not included in the protocol for vaccination of the herds. The weight of the animals was not evaluated due to the distinct nutritional managements found in the properties No increase in mortality after weaning was reported in the herd in this study.

DNA was extracted from serum samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit® (Roche, Germany) according manufacturer's instructions, and submitted to two previously published PCR assays: a nested polymerase chain reaction (nested-PCR) [6] and a quantitative PCR [7], both based on PCV-2 open reading frame 2 (ORF2).

The qPCR assay used in the detection and quantification of PCV-2 in clinical specimens were performed using the TaqMan® hydrolysis probes system [7]. The synthetic curve was drawn using the GeneArt program. The gene block was synthesized on a 2486 bp plasmid DNA segment with a 112 bp insert. The sequence that encodes the capsid protein gene and was used as template was available from GenBank (AF465211). The real-time test was standardized according to MIQE guidelines[8]. The qPCR reactions were performed in duplicate using the

TaqMan Universal Master Mix® II with UNG (Applied Biosystems, Foster City, California, US) in an ABI PRISM 7500® 155 Real156 Time System (Applied Biosystems). Samples with cycle threshold (Ct) less than or equal to 39 were considered positive in the qPCR.

Statistical analysis

All PCV-2 viral loads were analyzed on a log-transformed scale. To compare the mean viral loads with the animal data, the LSD (least significance difference) test was used. Considering nested-PCR as the "standard method", the performance of qPCR as a diagnostic method to determine the presence of PCV-2 was assessed by the calculation of sensitivity, specificity, and Kappa coefficient (agreement). Values of $P<0.05$ were considered statistically significant. The Statistical Package for the Social Science was used for the data analysis.

Results

The results of the nested and real-time PCR for PCV-2 detection are presented in Table 1. Comparing the two methods, an overall agreement of the results was found in 65% of cases (39 out of 60) and the concordance was 73.15%. No statistically significant difference was observed between the techniques used (P=0.81).

Table 1. Cross-classified test results for the detection of PCV-2 DNA in swine sera by nested-PCR and qPCR (149 samples).

		Nested-PCR		
Real-time PCR		**(+)**	**(-)**	**Total**
	(+)	**39**	**19**	**58**
	(-)	**21**	**70**	**91**
	Total	**60**	**89**	**149**

Concordance = 73.15% (109/149)

Sensitivity = 65% (39/60)

Specificity = 78.7% (70/89)

Starting from the serial dilutions of the synthetic curve, the value of the quantification cycle (Ct) for each viral load with a concentration between 6.66×10^2 and 6.66×10^9 genomic copies per 25 µL solution was established (Figure 1).

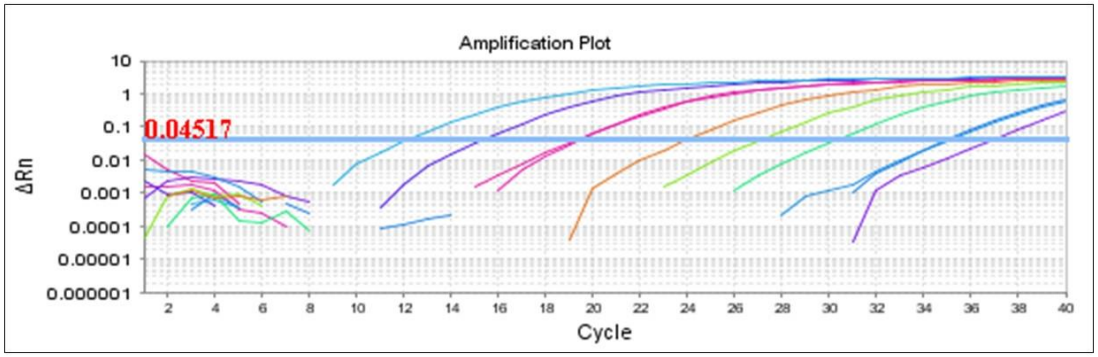


Fig. 1 – Amplification curve of the PCV-2 TaqMan assay; Blue = 10^9 copies, Purple = 10^8, Pink = 10^7, Brown = 10^6 copies, Light Green = 10^5 copies, Green = 10^4 copies, Blue = 10^3 copies, Purple = 10^2 copies. Image generated by the Step One v2.3® program.

The values of the linear regression coefficients (R^2) and efficiency rate (Eff%) of the qPCR assay performed with the synthetic standard curve were high and equal to 0.985 and 90.2%, respectively (Figure 2). Samples with a Ct less than or equal to 39 were considered positive (58/149). Analysis of the figure demonstrated that the Ct values were influenced by the concentration of the samples, and therefore, by the number of copies of DNA. This relationship was inversely proportional, since the lower the number of copies, the higher the Ct value obtained.

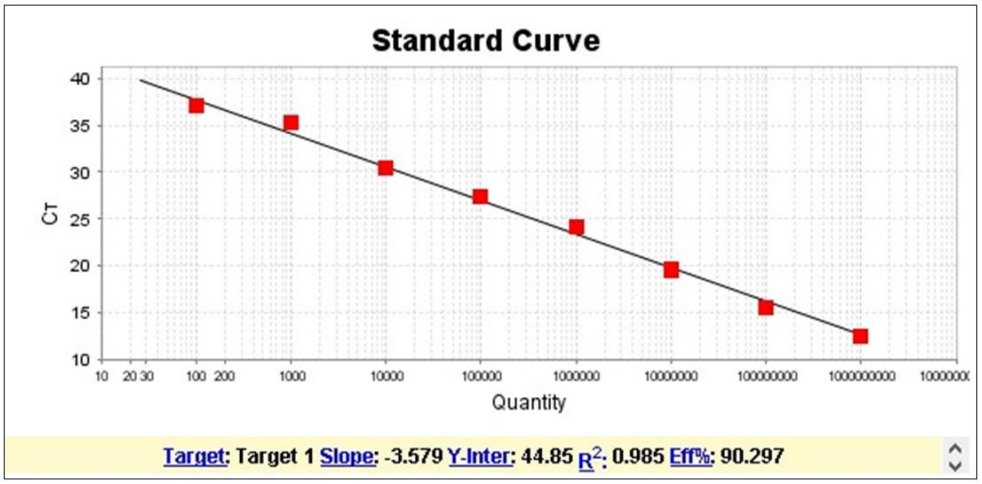


Fig. 2 - Graph of the linear regression coefficient (R^2) and efficiency rate (Eff%) of the qPCR assay with the different dilutions of the synthetic curve. Image generated by the Step One v2.3® program.

PCV-2 DNA was quantified in samples from 14 (21.5%) of the 65 asymptomatic pigs with an average viral load of 2,390 GC/mL. Of the symptomatic pigs (n=84), PCV-2 DNA was quantified in 44 animals (52%) with an average viral load of 3,467 GC/mL. A significant ($P<0.05$) difference in PCV-2 DNA viral load was detected between pigs with and without clinical signs. The average viral load in animals with diarrhea, respiratory signs, and multiple signs is shown in table 2. No statistically significant difference (p=0.387) was observed between viral load at different production phases (Table 3).

Table 2. Average viral load and variation of PCV-2 DNA viral load in relation to clinical signs.

Clinical signs	Average viral load (GC/mL**)**	Viral load variation (GC/mL**)**

No clinical signs (n=14)	2,390[a]		1,535 – 3, 245
With Clinical signs (n=44)	3,467[b]	Enteric (n=10) 4,596[b]	3,807 – 5, 386
		Respiratory (n=24) 3,285[a]	2, 592 – 3, 978
		Multiple (n=10) 2,519[a]	1, 675 – 3, 363

Different letters between lines means statistical difference (P<0,05).

Table 3. Average viral load and variation of PCV-2 DNA viral load in relation to production phases.

Production phases	Average viral load	Viral load variation
Nursery (n=13)	3,103	2,222 – 3, 983
Growth (n=120)	3,403	2, 9986 – 3, 820
Finishing (n=16)	2,778	1, 930 – 3, 627

Discussion

The clinical diagnosis of circoviruses is difficult due to the high number of clinical presentations, therefore, laboratory techniques are fundamental for adequate preventive management [3, 4]. The immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) techniques are considered gold standards for the diagnosis of PCV2-SD [3]; however, some authors have already demonstrated the equivalent sensitivity of molecular techniques [9, 10].

Since 2013, our laboratory has used nested-PCR to detect PCV2 in pig serum [5]. In order to improve the molecular diagnostic approaches for PCV-2, we compared the performance of real-time PCR and nested-PCR for the detection of PCV-2 in serum samples. Our results revealed no significant difference (P=0.81) between the techniques used, which is in agreement with previously published articles [11, 12].

The PCV-2 viral load in serum was measured using real-time quantitative PCR (qPCR), which has the advantage over conventional PCR of being faster and more robust against contamination due to the minimal manipulation of the sample in closed tube assays [7]. In addition, the synthetic curve was successfully used instead of cloning for the standardization of quantitative PCR for PCV-2, which provides a faster execution of the technique. The use of serum to monitor infections by molecular techniques has the advantage of being carried out in live animals [5, 7], and histopathology requires access to histopathological expertise, which is not available in all diagnostic laboratories.

It has been shown that PCV-SD-bearing pigs harbor and excrete higher PCV2 loads (10^7–10^8) than unaffected pigs [7, 9, 13]. Here, we confirm that pigs with diarrhea have a higher average viral load in serum than asymptomatic pigs, although the mean viral load observed in the pigs with diarrhea (10^4) was much lower than that reported by other authors with different

biological samples [7, 9, 14]. Although diarrhea is not the first clinical sign associated with the circovirus [1], veterinarians should consider a differential diagnosis of PCV2 in the face of diarrhea on farms.

In recent work carried out in our laboratory, a strong association between the presence of PCV-2 DNA in pig serum and diseased animals was observed [5]. Although many studies have already associated the serum viral load with the presence of histopathological lesions [7, 9, 15], our result suggests that the serum viral load can be used as an individual indicator of PCV2-SD status without histopathology, since a strong association between PCV-2 serum load and animals with clinical signs of PCV2-SD was observed. In addition, we support the idea that only the detection of the virus in individual pig serum samples is enough for a swine farm to adopt prevention and control measures in unvaccinated herds.

Conclusion

In conclusion, pig serum is a viable clinical sample to monitor PCV-2 infections by molecular techniques, and real-time PCR was shown to be a useful diagnostic tool that could be used for both PCV-2 detection and viral load quantification, enabling the rapid adoption of herd prevention measures.

Declaration of interest: None.

Ethical approval: This research was conducted with Federal Fluminense University Ethics Committee of Animal Research approval (CEUA/UFF number 2491130718)

Authors' contributions: TXC and RLS designed the study. ACMC, ILFR, AES, and RLS collected the samples. ACMC collected the data. ACMC, ILFR, and AES conducted the experiments. FBK and GSN contributed to the analysis and interpretation of the data. ACMC wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Baró J, Segalés J, Martínez J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: an independent condition or part of the systemic disease? *Vet Microbiol*. 2015; 176(1-2):83-87.

2. Pablo Alarcon, Jonathan Rushton, and Barbara Wieland. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – an economic disease model. *Prev Vet Med.* 2013; 110(2):88-102.

3. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 2012; 164(1-2):10-19.

4. Afolabi KO, Iweriebor BC, Okoh AI, Obil LC. Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa. *Adv Virol*. Volume 2017, Article ID 6807964, 16 pages http://dx.doi.org/10.1155/2017/6807964

5. Cruz ACM, Silveira RL, Baez CF, Varella RB, Castro TX (2016) Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. *Vet Microbiol*. 195, 15 Nov 2016, 154-157.

6. Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec*. 2001; 149(8):304-305.

7. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods*. 2004; 117(2):75-80.

8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines:

minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4):611-22.

9. Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol*. 2005; 111(3-4):223-229.

10. Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M. Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(5): 1848-1850.

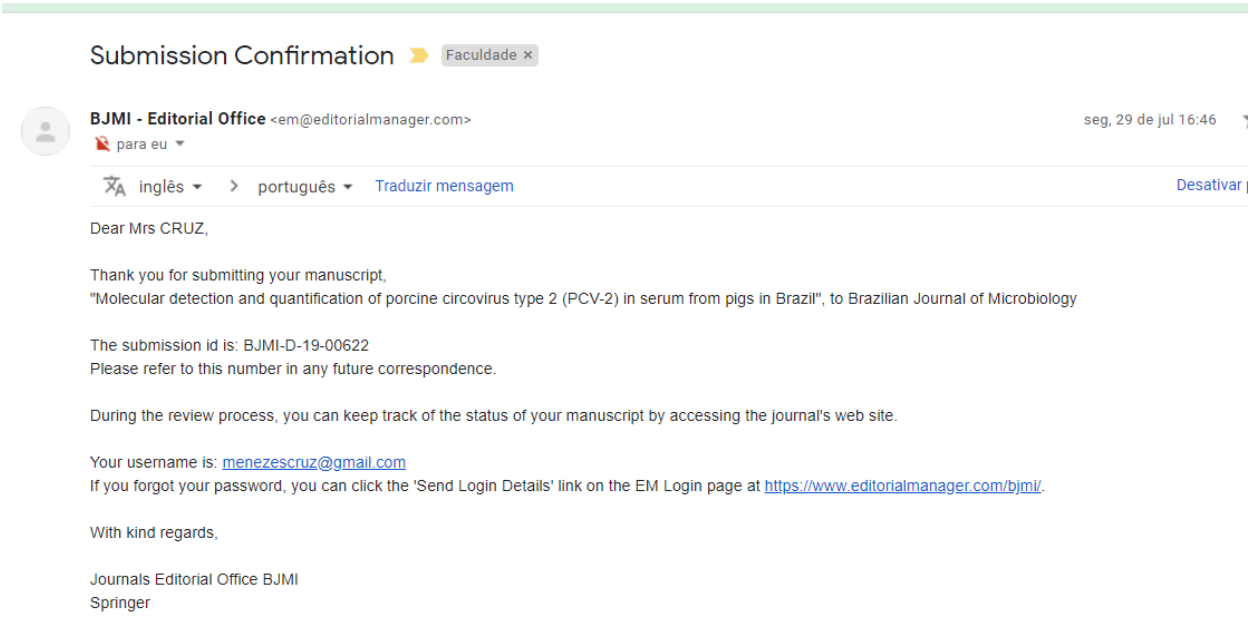
11. Da Silva, F.M.F., Junior, A.S., Peternelli, E.F.O., Viana, V.W., Chiarelli Neto, O., Fietto, J.L.R., Vargas, M.I.; Nero, L.A., Almeida, M.R. Retrospective study on porcine circovirus-2 by nested PCR and Real Time PCR in archived tissues from 1978 in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011; 42(3):1156-1160.

12. Yuan, W., Li, J., Li, L., Sun, M., Zheng, Y., Qi, Y., Sun, J., Song, Q. Rapid detection of Porcine Circovirus type 2 by TaqMan-based Real-time chain reaction assays. *Int J Appl Res Vet Med*. 2014; 12(3):214-220.

13. López-Soria S, Sibila M, Nofrarías M, Calsamiglia M, Manzanilla EG, Ramírez-Mendoza H, Minguez A, Serrano JM, Marín O, Joisel F, Charreyre C, Segalés J. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. Vet Microbiol 2014; 174(3-4):296-301.

14. Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods*. 2004; 122(2):171-178.

15. Cortey M, Napp S, Alva A, Pileri E, Grau-Roma L, Sibila M, Segalés J. Theoretical and experimental approaches to estimate the usefulness of pooled serum samples for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest*. 2011; 23(2):233-240.



Submission Confirmation Faculdade ×

BJMI - Editorial Office <em@editorialmanager.com> seg, 29 de jul 16:46

para eu

inglês › português Traduzir mensagem Desativar

Dear Mrs CRUZ,

Thank you for submitting your manuscript,
"Molecular detection and quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in serum from pigs in Brazil", to Brazilian Journal of Microbiology

The submission id is: BJMI-D-19-00622
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's web site.

Your username is: menezescruz@gmail.com
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at https://www.editorialmanager.com/bjmi/.

With kind regards,

Journals Editorial Office BJMI
Springer

9.3 ANEXO 3 – Artigo submetido ao Transboundary and Emerging Diseases

MOLECULAR DETECTION AND CLINICAL ASPECTS OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV-3) INFECTION IN PIGS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL

PCV-3: molecular detection and clinical aspects in pigs from Brazil

Ana Claudia de Menezes Cruz[1*], Ingrid Lyrio Figueira Rodrigues[1], Amanda Eduarda de Souza[1], Fabiana Batalha Knackfuss[2], Renato Luiz Silveira[1,3], Tatiana Xavier de Castro[1]

1 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.

2 Escola de Ciências da Saúde, Medicina Veterinária, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Brasil.

3 Departamento de Morfologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.

* menezescruz@gmail.com

ABSTRACT

Porcine circovirus 3 (PCV-3) is a third member of the genus *Circovirus* family *Circoviridae* able to infect swine. PCV-3 genome has been detected in pigs with different clinical conditions and apparently healthy, in all ages, and in multiple samples. Here, we report the molecular detection of PCV-3 with a nested PCR designed for this study in swine serum samples from Southeastern Brazil. The epidemiology and clinical aspects of the PCV-3 infection was evaluated. In addition, the co-infection PCV-3 with PCV-2, TTSuV-1 and 2 was also reported. The serum samples were originating from 154 pigs with different production phases and clinical signs, from both gender, and from 31 farms visited between 2013 and 2018. In this study, PCV-3 was detected in 26.7% of swine serum samples from healthy animals and animals with varied clinical signs, of both gender, and of varying ages, with an expected frequency. Statistical association (p=0.017) was observed only between asymptomatic animals and PCV-3, and no animal PCV-3 positive was with diarrhea in our study. No statistical association was observed between the PCV-3 and the ages, or gender, of the pigs. Co-

infections with PCV-2, TTSuV-1 and 2 were observed, without statistical association. Because it is a newly discovered virus, and there is almost few information about its epidemiology, we hope that this data help for future study of the PCV-3 epidemiology.

KEYWORD: molecular detection, nested PCR, swine serum, Brazil

INTRODUCTION

Porcine circovirus 3 (PCV-3) is a virus belonging to the family *Circoviridae* and was recently described in the USA (PHAN *et al*., 2016; PALINSKI *et al*., 2017). It represents the able to infect swine, together with PCV-1, considered non-pathogenic, and PCV-2, one of the most economically relevant viruses for the swine worldwide industry. Taking into account, a new member of the same family as PCV-3 should not be neglected (KLAUMANN *et al*., 2018a). PCV-3 genome has been detected at all swine tested ages, and in multiple samples like serum, tissue, colostrum, and feces (KU et al., 2017; KWON et al., 2017; FRANZO et al., 2017; KEDKOVID et al., 2018; KLAUMANN et al., 2018b). Also, PCV-3 genome has been detected in pigs with different clinical conditions such as respiratory, reproductive, gastrointestinal, multi-systemic inflammation, and neurological disorders (PHAN et al., 2016; CHEN et al., 2019; PALINSKI et al., 2017; ZHAI et al., 2017; KEDKOVID et al., 2018). However, the virus has been also detected in apparently healthy animals (ZHENG et al., 2017a; GUO *et al*., 2019). Furthermore, coinfection of PCV3 with other agents like PCV-2, TTSuV1 and 2, has already been published (ZHENG *et al*., 2017b; OUYANG *et al*., 2019). The detection of the virus is currently based on molecular techniques (FU *et al.,* 2017; KIM *et al.,* 2017; KU *et al.,* 2017). Studies on epidemiology, pathogenesis, immunity and diagnosis are still in the beginning (KLAUMANN *et al*., 2018a).

Therefore, the aim of this study was to perform the molecular detection of PCV-3 with a nested PCR designed for this study in swine serum samples from Southeastern Brazil in order to elucidate the epidemiology and clinical aspects of the infection in this population. In addition, the coinfection between PCV-3 and other important virus commonly detected in pigs (Porcine circovirus type 2, Torque teno sus virus 1 and 2) was also reported.

MATERIAL AND METHODS

Between 2013 and 2018, swine serum samples (n=154) were collected from 31 conventional pig farms located in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Southeastern Brazil The pigs included in this study were classified into three categories according to age: nursery (3-10 weeks), growth (11-15 weeks) and finishing (≥ 16 weeks). Of the 154 animals, 77 were female and 77 were males. The same veterinarian performed the clinical examination prior to blood collection and all data were recorded for further analysis. In addition, the animals were separated into four categories according to the clinical signs presented at the time of samples collection: animals with diarrhea, animals with respiratory signs (cough, sneeze and secretion), animals with multiple signs (arthritis, cough, and diarrhea), and animals with no clinical signs as described by Cruz et al. (2016). All samples were previously tested for PCV-2, TTSuV-1 and 2 (CRUZ *et al.*, 2016).

DNA was extracted from serum samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit® (Roche, Germany) according manufacturer's instructions. For PCV-3 molecular detection, a PCR protocol previously published was used to amplify a 648 bp fragment from capsid protein gene (ORF2) (1339-1987) (KU *et al*., 2017). In order to increase the PCR limit detection in swine serum samples, a nested PCR primers (5'CCATTGAACGGTGGGGTCAT-3'/ 5'-TGGACCACAAACACTTGGCT-3') were designed with the *Prime 3* software (available at http://primer3.sourceforge.net/), based in the sequence KY076027 (KU *et al.,* 2017), available on *GenBank*. The primers targed a 203 bp internal fragment (1442-1645) of the ORF2 region gene, and the reaction was performed with 11µl of a commercial master mix, 10pmol of each PCV3-NF and PCV3-NR primers, and 5µl of template DNA. Final reaction volume was 20µl. The thermal cycling conditions were as follows: 94ºC for 5 min, followed by 35 cycles of 94ºC for 30 s, 52ºC for 30 s, 72ºC for 30 s, and 72ºC for 10 min. The PCR products were separated using a 1.5**%** agarose gel (GIBCO-BRL®), and electrophoresis was carried out in 1 X TAE buffer at 70V for 90 min. The images were generated in an image capture system (BioImaging Systems®) using the Labworks 4.0 program.

The specificity of the new primers was confirmed by sequencing four products (samples RJ019, RJ031, ES309 and ES310). Bidirectional sequencing was performed by Myleus Biotechnology

(Belo Horizonte, Brazil) using an ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) automated sequencer using BigDye v3.1.

In order to verify whether there was a significant difference between positive and negative animal frequencies by production phases, clinical signs, and gender, the Chi-Square test was performed, using the SPSS18.0 program.

RESULTS

Based on nested PCR, PCV-3 was detected in 41 of 154 (26.7%) swine serum samples. In addition, the virus was detected in 48.4% (15/31) of the farms, and in 53.3% (8/15) of the cities of the State of Rio de Janeiro and in 4/5 (80%) of the cities of the State of Espirito Santo.

Concerning the production phase, the viruses was more frequent in the growing (68.3%) and less frequent in the finishing (14.7%) but no statistical association was observed between PCV-3 and the production phases (p=0.357) (Table 1).

Of the 83 animals presenting clinical manifestation, 21 (51.2%) were PCV-3 positive. Also, of the 71 animals with no clinical presentation, 20 (48.8%) were positive for the virus (Table 1). The statistical association (p = 0.017) was observed only between asymptomatic animals and PCV-3 (Table 1). Analyzing animal gender, 46.3% of females and 53.7% of males were positive for PCV-3. The gender of the animals had no significant effect on PCV3 positivity (p = 0.985) (Table 1).

Co-infections PCV-3 with PCV-2, TTSuV-1 and TTSukV-2 was observed in 13 (31.7%), 19 (46.3%), and 14 (34.1%) samples, respectively. Triple infection (PCV-3 with PCV-2, TTSuV-1 and 2) was observed in 3 (7%) samples. No statistical association was observed between coinfections and clinical signs.

DISCUSSION

PCV-3 was first described in 2015 and publications on PCV-3 detection and circulation in different clinical swine samples from different countries began to emerge from 2016 (PHAN *et al.*, 2016; PALINSKI *et al.*, 2017; FRANZO *et al*., 2017; KLAUMAN *et al*., 2018b; OUYANG *et al*., 2019). Given the limited information on the circulation of this agent in Brazil, and the possibility of PCV-3 having as important an economic impact as PCV-2, there was a need to investigate the presence of PCV-3 in swine serum samples in Rio de Janeiro and Espirito Santo, Southeastern Brazil.

The conventional PCR is considered to be most suitable diagnostic technique for the detection of PCV-3 (FU *et al.,* 2017; KIM *et al.,* 2017; KU *et al.,* 2017). The first test performed in our laboratory with swine serum tested negative, and a nested PCR was designed based on ORF2 (capsid protein gene) to enhance the sensitivity of the reaction in this clinical sample, successfully.

The first PCV-3 molecular study performed in Brazil was based on serum samples obtained in two farms (TOCHETTO *et al.,* 2018). A second study conducted in nine Brazilian states (SARAIVA *et al.,* 2019) described the PCV-3 presence in all of the analyzed states. Our results confirmed the circulation of the PCV-3 in Rio de Janeiro e Espirito Santo. Different studies did report the PCV-3 prevalence in diverse clinical samples, ranging from 1.85% to 65.0% (ZHAI *et al.,* 2017; WEN *et al*., 2018; ZOU *et al.,*2018; QI *et al.,* 2019; SARAIVA *et al.,*2019). Studies using serum as a clinical sample had a prevalence ranging from 28.7% to 65.0% (KU *et al.,* 2017; PALINSKI *et al*., 2017; STADEJEK *et al.,* 2017). In this study, PCV-3 was detected in 26.7% of swine serum samples from healthy animals and animals with varied clinical signs, of both gender, and of varying ages, with an expected frequency. In fact, according to Klaumann et al. (2019), there is no specific pattern of PCV-3 infection that can be inferred from its detection frequency.

The values found in this study regarding the frequency of PCV-3 in the cities and farms are in agreement with values previously published (KWON *et al.,* 2017; STADEJEK *et al.,* 2017; TOCHETTO *et al.,* 2018; QI *et al.,* 2019; SARAIVA *et al.,* 2019). However, it was no possible to associate the presence of the virus with geographic characteristics of the cities and characteristics of the farms due the lack of information about the epidemic situation of the cities and the management used in the farms (SAPORITI *et al.,* 2019; SARAIVA *et al.,* 2019).

Concerning to the age, our results showed the presence of the virus in all production phases, according with others studies (KU *et al.,* 2017; ZHAI *et al.,* 2017; KLAUMANN *et al.,* 2019; SUKMAK *et al.,* 2019). No statistical association was observed between the production phases and PCV-3, suggesting that PCV-3 infection is ubiquitous on farms, affecting animals of all ages (KLAUMANN *et al.,* 2019; SUKMAK *et al.,* 2019). This result is consistent with Klaumann and colleagues (2018b) who claim that is not possible to associate PCV-3 infection at any specific age.

No animal PCV-3 positive was with diarrhea in our study. Qi et al. (2019) found a different result, but the authors do not claim that the virus was the primary agent of diarrhea, since other agents have not been researched. However, our results allows to state that PCV-3 was not the causative agent of diarrhea, since no single virus-positive animal was observed. Even though it has already been detected in the intestine (QI *et al.*, 2019), until now, there is no evidence that PCV-3 causes diarrhea as PCV-2 does.

In our study, asymptomatic animals showed a statistically significant association with the presence of PCV-3, suggesting that PCV-3 can causes subclinical infections like PCV-2. Based on data published, it is not established whether PCV-3 infection is related to a particular pathological condition or to any specific age (KLAUMANN *et al.*, 2018b). Despite good progress in PCV-3 epidemiology, the circulation status of PCV-3 in pigs with different clinical presentations (especially asymptomatic or diarrhea) was not well established (ZHAI et al., 2017; ZOU *et al.*, 2018).

So far, no articles were found evaluating the weight and sex of the animals in relation to the PCV-3 infection; therefore, it is not possible to make any comparison with the data obtained in this work. However, 75.6% of the PCV-3 positive animals were underweight, and 41.9% of these animals had PCV-3 and 2 coinfection suggesting that PCV-3, like PCV-2, plays an important role in animal weight loss.

Published studies demonstrate a PCV-3 coinfection with other agents (HA *et al*., 2018; ZHENG *et al*., 2018b; GUO *et al*., 2019; OUYANG *et al*., 2019 ; SUKMAK *et al*., 2019). TTSuV is one of the most common in PCV-3 positive animals, with co-infection rates ranging from 8.6% to 83.3% in sick and healthy animals (HA *et al*., 2018; ZHENG *et al*., 2018b). Studies also point to the co-infection rate of PCV-3 with PCV-2 ranging from 1.26% to 61.54%, (FU *et al*., 2017; KIM *et al*., 2017; HA *et al*., 2018; ZHENG *et al*., 2018b; CHEN *et al*., 2019; SARAIVA *et al*., 2019; SUKMAK *et al*., 2019). The results obtained in our study are as expected, and no association was observed between PCV-3 and other viruses. According to Ouyang et al. (2019), co-infections are common in pig farms, but further studies are needed to assess the importance of PCV-3 in these co-infections.

In conclusion, we confirmed the presence of PCV-3 in serum from animals with and without clinical signs, both gender, and with varying ages. In addition, we observed that co-infection between

PCV-3, and other viruses was detected in animals with and without clinical signs. Because it is a newly discovered virus, and there is almost no information about its epidemiology, we hope that this data help for future study of the PCV-3 epidemiology.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have declared no conflict of interest.

ETHICS STATEMENT

The study protocol was approved by the Federal Fluminense University Ethics Committee of Animal Research approval (CEUA/UFF number 2491130718).

ORCID

A.C.M. Cruz https://orcid.org/0000-0002-4520-6884

REFERENCES

Chen, N., Huang, Y., Ye, M., Li, S., Xiao, Y., Cui, B., & Zhu, J. (2019). Co-infection status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) in eight regions of China from 2016 to 2018. *Infections, Genetics and Evolution*, *68*, 127-135. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.011

Cruz, A.C.M., Silveira, R.L., Baez, C.F., Varella. R.B., & Castro, T.X. (2016). Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. *Veterinary Microbiology*, *195*, 154-157. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.09.012

Franzo, G., Legnardi, M., Hjulsager, C.K., Klaumann, F., Larsen, L.E., Segalés, J., & Drigo, M. (2017). Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 fields strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 602-606. https://doi.org/10.1111/tbed.12836

Fu, X., Fang, B., Ma, J., Liu, Y., Bu, D., Zhou, P., Wang, H., Jia, K., & Zhang, G. (2017). Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in

southern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 296-303. https://doi.org/10.1111/tbed.12752

Guo, Z., Li, X., Deng, R., & Zhang, G. (2019). Detection and genetic characteristics of porcine circovírus 3 based on oral fluids from asymptomatic pigs in central China. *BMC Veterinary Research*, 15, 200-205. https://doi.org/10.1186/s12917-019-1952-3

Ha, Z., Xie, C., Li, J., Wen, S., Zhang, K., Nan, F., Zhang, H., Guo, Y., Wang, W., Lu, H., & Jin, N. (2018). Molecular detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in pigs from Northeast China. *BMC Veterinary Research*, 14, 321- 327. https://doi.org/10.1186/s 1297-018-1634-6

Kedkovid, R., Woonwong, Y., Arunorat, J., Sirisereewan, C., Sangpratum, N., Kesdangsakonwut, S., Tummaruk, P., Teankum, K., Assavachhep, P., Jittimanee, S., & Thanawongnuwech, R. (2018). Porcine circovirus type 3 (PCV3) shedding in sow colostrum. *Veterinary Microbiology*, 220, 12-17. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.004

Kim, H.R., Park, Y.R., Lim, D.R., Park, M.J., Park, J.Y., Kim, S.H., Lee, K.K., Lyoo, Y.S., & PARk, C. K. (2017). Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *Journal of Virological Methods*, 250, 11-16. https://doi.org/10.1016/j.viromet.2017.09.021

Klaumann, F., Correa-Fiz, F., Franzo, G., Sibila, M., Nunez, J.I., & Segalés, J. (2018a). Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 1-13. https:///doi.org/10.3389/fvets.2018.00315

Klaumann, F., Franzo, G., Sohrmann, M., Correa-Fiz, F., Drigo, M., Nuñez, J.I., Sibila, M., & Segalés, J. (2018b). Retrospective detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in pig serum samples from Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 1290-1296. https://doi.org/10.1111/tbed.12876

Klaumann, F., Correa-Fiz, F., Sibila, M., Nuñez, J.I., & Segalés, J. (2019). Infection dynamics of porcine circovírus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. *Veterinary Record*, 184, 619. http://doi.org/10.1136/vr.105219

Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Mu, W., & He, Q. (2017). Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 703-708. https:///doi.org/10.1111/tbed.12638

Kwon, T., Yoo, S.J., Park, C.K., & Lyoo, Y.S. (2017). Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Veterinary Microbiology*, 207, 178-180. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.013

Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., & Ren, L. (2019). Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*, 11, 185-199. https://doi.org/10.3390/v.11020185

Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, e., & Hause, B.M. (2017). A novel porcine Circovirus distantly related to known circoviruses is associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and reproductive failure. *Journal of Virology*, 91, 1-13. https://doi.org/10.1128/jvi.01879-16

Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., & Delwart, E. (2016). Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal*, 13, 1-8. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0642-3z

Qi, S., Su, M., Guo, D., Li, C., Wei, S., Feng, L., & Sun, D. (2019). Molecular detection and phylogenetic analysis of porcine circovírus type 3 in 21 provinces of China during 2015-2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66, 1004-1015. https://doi.org/10.1111/tbed.13125

Saporiti, V., Cruz, T.F., Correa-Fiz, F., Nuñez, J.I., Sibila, M., & Segalés, J. (2019) Similar frequency of *Porcine circovírus* 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs affected by digestive or respiratory disorders and age-matched clinically healthy pigs. *Transboundary and Emerging Disease*, 00:1-7. https://doi.org/10.1111/tbed.13341

Saraiva, G.L., Vidigal, P.M.P., Assao, V.S., Fajardo, M.L.M., Loreto, A.N.S., Fietto, J.L.R., Bressan, G.C., Lobato, Z.I.P., Almeida, M.R., & Silva-Junior, A. (2019). Retrospective detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 (PCV3) strains identified between 2006 and 2007 in Brazil. *Viruses*, 11, 201-212. https://doi.org/10.3390/v11030201

Stadejek, T., Wozniak, A., Mitek, D. & Biernacka, K. (2017). First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 1350-1353. https://doi.org/10.1111/tbed.12672

Sukmak, M., Thanantong, N., Poolperm, P., Boonsoongnern, A., Ratanavanichrojn, N., Jirawattanapong, P., Woonwong, Y., Soda, N., Kaminsonsakul, T., Phuttapatimok, S., & Wajjwalku, W. (2019). The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66, 611-616. https://doi.org/10.1111/tbed.13057

Tochetto, C., Lima, D.A., Varela, A.P.M., Loiko, M.R., Pain, W.P., Scheffer, C.M., Herpich, J.I., Cerva, C., Schmitd, C., Cibulski, S.P., Santos, A.C., Mayer, E.Q., & Roehe, P.M. (2018). Full-genome sequence of porcine circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65, 5-9. https://doi.org/10.1111/tbed.12735

Wen, S., Sun, W., Li, Z., Zhuang, X., Zhao, G., Xie, C., Zheng, M., Jing, J., Xiao, P., Wang, M., Han, J., Ren, J., Liu, H., Lu, H., & Jin, N. (2018). The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 27-31. https://doi.org/10.1111/tbed.12754

Zhai, S.L.; Zhou, X.; Zhang, H.; Hause, B.M.; Lin, T.; Liu, R.; Chen, Q.L.; Wei, W.K., Lv, D.H., Wen, X.H., Li, F., & Wang, D. (2017). Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virology Journal*, 14, 222-228. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0892-4

Zheng, S., Wu, X., Zhang, L., Xin, C., Liu, Y., Shi, J., Peng, Z., Xu, S., Fu, F., Yu, J., Sun, W., Xu, S., Li, J., & Wang, J. (2017a). The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1337-1341. https://doi.org/10.1111/tbed.12667

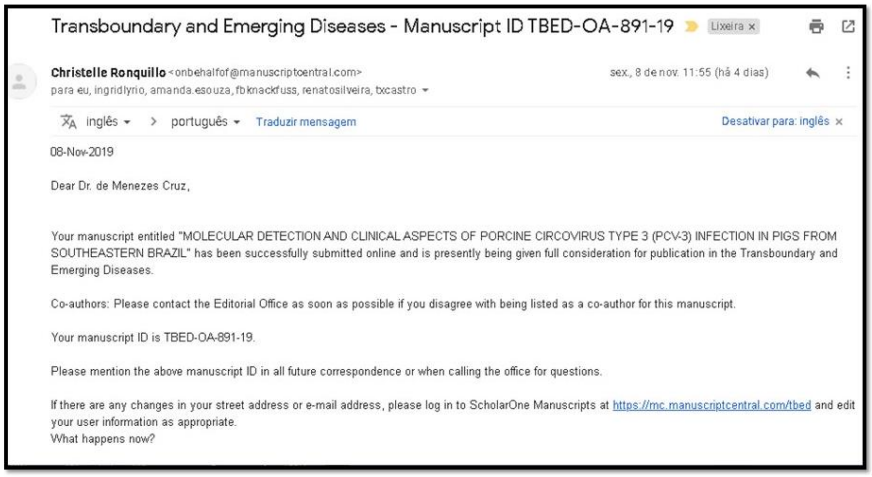
Zheng, S., Shi, J., Wu, X., Peng, Z., Xin, C., Zhang, L., Liu, Y., Gao, M., Xu, S., Han, H., Yu, J., Sun, W., Cong, X., Li, J., & Wang, J. (2017b). Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 1-4. https://doi.org/10.1111/tbed.12792

Zou, Y., Zhang, N., Zhang, J., Zhang, S., Jiang, Y., Wang, D., Tan, Q., Yang, Y., & Wang, N. (2018). Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan, China. *Archives Virology*, 163, 2841-2847. https://doi.org/10.1007/s00705-018-3914-7

Table 1: PCV-3 DNA detection according to production phases and clinical signs (N=154).

Characteristic	**PCV-3 (N=41)**	**p value**
Production phase	N (%)	0.357
Nursery (N=21)	7 (17)	
Growing (N=114)	28 (68.3)	
Finishing (N=19)	6 (14.7)	
Clinical signs	N (%)	0.017*
Diarrhea (N=22)	0	
Respiratory (N=45)	16 (39)	
Multiple (N=16)	5 (12.2)	
No signs (N=71)	20 (48.8)*	
Gender	N (%)	0.985
Female (N=77)	19 (46.3)	
Male (N=77)	22 (53.7)	

*Significant at 5%



Transboundary and Emerging Diseases - Manuscript ID TBED-OA-891-19 Lixeira ×

Christelle Ronquillo <onbehalfof@manuscriptcentral.com> sex., 8 de nov. 11:55 (há 4 dias)
para eu, ingridlyrio, amanda.esouza, fbknackfuss, renatosilveira, txcastro

inglês › português Traduzir mensagem Desativar para: inglês ×

08-Nov-2019

Dear Dr. de Menezes Cruz,

Your manuscript entitled "MOLECULAR DETECTION AND CLINICAL ASPECTS OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV-3) INFECTION IN PIGS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Transboundary and Emerging Diseases.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is TBED-OA-891-19.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions.

If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at https://mc.manuscriptcentral.com/tbed and edit your user information as appropriate.
What happens now?

9.4 ANEXO 4 – Participação em eventos e publicações

9.4.1 *Palestras proferidas*

Atualidades sobre o circovírus suíno, 41ª Semana Acadêmica Américo de Souza Braga, módulo Produção e Sanidade de Aves e Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2018.

Circovirose Suína, Seminário de Produção e Sanidade Suína, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, RJ, 2019.

9.4.2 *Publicações*

ARTIGOS SUBMETIDOS

MOLECULAR DETECTION AND QUANTIFICATION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV-2) IN SERUM FROM PIGS IN BRAZIL

Cruz, ACM[1,a]; Rodrigues[1], ILF; Souza[1], AE; Knackfuss[2], FB; Souza, GN[3,5]; Silveira, RL[1,4] ; Castro, TX[1].

MOLECULAR DETECTION AND CLINICAL ASPECTS OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV-3) INFECTION IN PIGS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL

Ana Claudia de Menezes Cruz[1*], Ingrid Lyrio Figueira Rodrigues[1], Amanda Eduarda de Souza[1], Fabiana Batalha Knackfuss[2], Renato Luiz Silveira[1,3], Tatiana Xavier de Castro[1]

MOLECULAR DETECTION OF PORCINE CIRCOVIRUS (PCV-2), TORQUE TENO SWINE VIRUS 1 AND 2 (TTSUV1 AND TTSUVK2) AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN SWINE ORGANS SUBMITTED TO REGULAR SLAUGHTER IN BRAZIL.

A.E. Souza [a, *], A.C.M. Cruz [a], I.L. Rodrigues[a], E.C.Q. Carvalho [b], R.B. Varella[a], R.M. Medina [b], R.B. Ribeiro [b], R.L. Silveira [c], T.X. Castro[a]

RETROSPECTIVE AND EVOLUTIONARY STUDY OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 (PCV-3) IN SWINE TISSUE FROM BRAZIL (1967- 2018)

Rodrigues[1], ILF*; Cruz, ACM[1]; Souza[1], AE; Knackfuss[2], FB; Campello, CA; Silveira, RL[1,4] ; Castro, TX[1].

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

CRUZ, A. C. M.; SOUZA, A. E.; RODRIGUES, I. L. F.; KNACKFUSS, F. B.; SILVEIRA, R. L.; CASTRO, T. X. Comparação de técnicas moleculares para o diagnóstico da circovirose. Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 17, p. 191-192, 2019.

CRUZ, A. C. M.; SILVEIRA, R. L.; BAEZ, C. F.; VARELA, R. B.; CASTRO, T. X. Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. VETERINARY MICROBIOLOGY JCR, v. 195, p. 154-157, 2016.

SILVEIRA, RENATO LUIZ; **CRUZ, ANA CLAUDIA DE MENEZES**; MEDINA, RAPHAEL MANSUR; CÂMARA, JURANDYR DE ABREU; ABÍLIO, EDMUNDO JORGE; CARVALHO, EULÓGIO CARLOS QUEIROZ DE. Lesões pré-ulcerativas gastroesofágicas em miniporcos Gastroesophageal ulcer research in mini pigs. Revista Brasileira de Ciência Veterinária (Impresso), v. 22, p. 160-164, 2015.

RESUMOS EXPANDIDOS ANAIS DE CONGRESSO

SOUZA, A. E.**; CRUZ, A. C. M**.; RODRIGUES, I. L. F.; SILVEIRA, R. L.; CARVALHO, E. C. Q.; CASTRO, T. X. Diagnóstico histopatológico do Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em vísceras de suínos submetidos ao abate regular no estado do Espírito Santo. In: IX Congresso Internacional de Suinocultura, 2018, Foz do Iguaçú-PR. Anais do IX Congresso Internacional de Suinocultura, 2018. p. 279-280.

CRUZ, A. C. M.; RODRIGUES, I. L. F.; SOUZA, A. E.; SILVEIRA, R. L.; CASTRO, T. X. Torque Teno Sus virus no Brasil: Detecção molecular. In: XVIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES, 2017, Goiânia-GO. ABRAVES, 2017.

LIMA, M. M. S.; CASTRO, E. M.; **CRUZ, A. C. M**.; MOREIRA, B. M.; SILVEIRA, R. L.; RABELLO, R. F. Detecção de suínos colonizados por LA-MRSA no Estado do Rio de Janeiro. In: XVIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES, 2017, Goiânia-GO. ABRAVES, 2017.

DUTRA, A. C.; CASTRO, E. M.; BOTELHO, L.; **CRUZ, A. C. M**.; SILVEIRA, R. L.; MOREIRA, B. M.; RABELLO, R. Detection and characterization of methicilin resistant Staphylococcus isolated of healthy swines. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis-SC. XXVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

LIMA, M. M. S.; CASTRO, E. M.; **CRUZ, A. C. M**.; MARTINS, I. S.; MOREIRA, B. M.; SILVEIRA, R. L.; RABELLO, R. F. Ocorrência e caracterização de amostras de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina isoladas de suínos e de contatos humanos. In: XVII Encontro Científico do Instituto Biomédico - ECIB, 2017, Niterói-RJ. ECIB, 2017.

CRUZ, A. C. M.; RODRIGUES, I. L. F.; SOUZA, A. E.; SILVEIRA, R. L.; CASTRO, T. X. Quantificação da carga viral do Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em soro de suínos do Estado do Rio de Janeiro. In: XVII Encontro Científico do Instituto Biomédico - ECIB, 2017, Niterói-RJ. ECIB, 2017.

CRUZ, A. C. M.; SOUZA, A. E.; RODRIGUES, I. L. F.; SILVEIRA, R. L.; CASTRO, T. X. Determinação da carga viral do Circovírus suíno tipo II em amostras de soro de suínos do estado do Rio de Janeiro. In: III Semana Científica do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas. Instituto Biomédico-UFF, 2017, Niterói-RJ. Semana Científica PPGMPA, 2017.

SILVEIRA, R. L.; **CRUZ, A. C. M**.; KNACKFUSS, F. B.; BONAPARTE, T. P.; SILVA, M. A.; RIBEIRO, R. B.; MEDINA, R. M.; CAMARA FILHO, J. A.; SOARES, R. T. R. N.; ABILIO, E. J.; RODRIGUES, I. L. F.; CARVALHO, E. C. Q. Swine Helicobacteriosis: Injuries and immunohistochemistry in stomachs of piglets. In: 24th International Pig

Veterinary Society Congress, 2016, Dublin. 24th International Pig Veterinary Society Congress, 2016. p. 267-267.

CRUZ, A. C. M.; RODRIGUES, I. L. F.; SILVEIRA, R. L.; CASTRO, T. X.. Circovírus suíno tipo 2: Análise filogenética e determinação da carga viral em amostras de soro de suínos do Estado do Rio de Janeiro. In: II Semana Científica do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas. Instituto Biomédico-UFF, 2016, Niterói-RJ. II Semana Científica do Programa PGMPA, 2016.