

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

Tamires Gomes Cordeiro

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E TIPO 3**  
**EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE SORO E FLUIDO ORAL DE GRANJAS**  
**VACINADAS DA ZONA DA MATA EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Belo Horizonte

2024

Tamires Gomes Cordeiro

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E TIPO 3  
EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE SORO E FLUIDO ORAL DE GRANJAS  
VACINADAS DA ZONA DA MATA EM MINAS GERAIS BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte

2024

C794c Cordeiro, Tamires Gomes, 1994-  
Caracterização genética do circovirus suino tipo 2 e tipo 3 em amostras provenientes de soro e fluido oral de granjas vacinadas da Zona da Mata em Minas Gerais, Brasil/Tamires Gomes Cordeiro.- 2024.  
68 f. il.

Orientadora: Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.  
Bibliografia f. 55 a 60  
Anexo: f. 61 a 68.

I. Suino – Doenças - Teses – 2. Viroses em animais - Teses - I. Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**TAMIRES GOMES CORDEIRO**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**Caracterização genética do circovírus suíno tipo 2 e tipo 3 em amostras provenientes de soro e fluido oral de granjas vacinadas da Zona da Mata em Minas Gerais, Brasil.**"

Aprovado(a) em 24 de maio de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes - Orientador(a)  
Dr.(a). Roberto Mauricio Carvalho Guedes  
Dr.(a). Amanda Gabrielle de Souza Daniel



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 14/11/2024, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **amanda gabrielle de souza daniel, Usuário Externo**, em 18/11/2024, às 19:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 18/11/2024, às 22:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3736926** e o código CRC **23B17759**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a bênção da persistência, da disciplina e do foco, e por guiar meus passos através de pessoas tão maravilhosas em momentos de aprendizado.

Aos meus pais, Pedro e Irene, sou eternamente grata por seu apoio e amor incondicional. Seu encorajamento constante e crença em meu potencial foram as luzes que me guiaram nos momentos mais desafiadores.

Agradeço de coração às pessoas que, de diversas formas, contribuíram para meu crescimento.

À Ana Paula Brustolini, que além de ser uma amiga e confidente, é minha inspiração profissional, a primeira a me orientar e encorajar em direção ao mestrado. Seu profissionalismo, sabedoria e disciplina foram uma referência em minha jornada acadêmica.

Minha gratidão à Amanda Daniel, cujos ensinamentos e apoio foram indispensáveis para a aprovação na seleção da pós-graduação. Sua orientação foi fundamental e sou imensamente grata por sua valiosa contribuição para o meu sucesso.

À Coosuioponte, e em especial à gerente Paula Gomides, expresso meu profundo agradecimento por oportunizarem meu desenvolvimento profissional e por facilitarem meu ingresso no mestrado. Paula foi uma líder essencial para que eu pudesse realizar essa etapa importante em minha vida.

Agradeço profundamente aos produtores e colaboradores da Zona da Mata Mineira, que liberaram e me auxiliaram em cada coleta, também à minha estagiária, Carolina Cupertino. Sempre lembrarei do apoio e suporte que forneceram, especialmente quando precisei das amostras, que são o ponto central do meu trabalho.

Ao meu noivo Vinicius Baeta, expresso meu amor e gratidão por sua paciência e apoio. Sua presença foi uma âncora em momentos de estresse, e sua dedicação à minha felicidade diária não passou despercebida.

Agradeço sinceramente ao meu amigo Vanderlei Toledo pela amizade, parceria e apoio constante. Sua ajuda e torcida foram fundamentais para o meu crescimento.

Agradeço a Deus por direcionar cada pessoa que cruzou meu caminho durante esta jornada. À minha família Martins e à minha família Baeta, agradeço por seu apoio incondicional e pelo amor que me sustentou em cada passo. À minha família Gomes Pereira, agradeço por sempre torcerem e vibrarem com cada conquista que alcancei.

Agradeço também aos amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante a pesquisa: Ângela, Brendinha, Bruna, Mari e Renata. Um agradecimento especial à Grazi, cuja paciência, proatividade e altruísmo foram fundamentais em cada atividade laboratorial, desde a preparação até a análise dos resultados. Também agradeço ao Laboratório Aquacen pelo apoio na extração das amostras. Suas contribuições foram essenciais e tornaram essa jornada ainda mais significativa.

Por fim, e indispensável, expresso minha gratidão à minha orientadora e professora, Maria Isabel Coelho Maldonado Guedes, por me aceitar como aluna e orientanda, por seu estímulo e aprimoramento em apresentações para meu desenvolvimento, e por sua orientação e expertise ao longo deste processo. Também agradeço às outras duas professoras do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA), Prof<sup>a</sup> Zélia Lobato e Prof<sup>a</sup> Érica Azevedo, por estarem presentes e disponíveis para esclarecerem minhas dúvidas e à banca examinadora do projeto, o prof. Dr. Roberto Guedes e a Dra. Amanda Daniel, por terem aceitado participar deste momento de avaliação que representa todo meu aprendizado durante este período, me moldando como uma profissional competente e capaz.

Acredito firmemente que Deus coloca pessoas especiais em nossas vidas para nos apoiar e guiar. Agradeço a cada uma delas por fazerem parte da minha jornada e por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando.

Acreditar em Deus é acreditar que quando você decide, Ele te sustenta.

Obrigada!

## RESUMO

Os membros da família *Circoviridae* estão entre os menores vírus conhecidos, e quatro espécies foram identificadas até o momento: PCV1, PCV2, PCV3 e mais recentemente, o PCV4. O presente trabalho caracterizou geneticamente o circovirus suíno tipo 2 (PCV2) e tipo 3 (PCV3) em amostras oriundas da região da Zona da Mata Mineira, Brasil. Foram analisadas 467 amostras, compostas por 138 amostras de soro de matrizes e 329 amostras de soro e fluido oral de leitões vacinados de diversas idades, coletadas em nove granjas de ciclo completo localizadas nas microrregiões de Viçosa e Ponte Nova. A detecção de PCV2 foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), enquanto o PCV3 foi detectado por nested PCR. Amostras positivas para PCV2 no teste de qPCR foram submetidas a PCR convencional para genotipagem. As amostras foram categorizadas por faixa etária, sendo 138 amostras de matrizes, 116 amostras de leitões na fase de creche, 109 suínos na fase de recria e 104 suínos na fase de terminação. Além disso, foi aplicado um questionário aos produtores, focado em biossegurança e vacinação. A possibilidade de utilização do fluido oral como amostra biológica para diagnóstico de PCV2 e PCV3 também foi avaliada. Os resultados indicaram uma baixa proporção de amostras com cópias genômicas maior ou igual a 7 em todas as fases de produção, sendo nula no soro de matrizes e variou entre 5,78% e 17,31% em amostras de soro e fluido oral de animais de crescimento. A maioria das amostras apresentou carga viral correspondente à apresentação subclínica, variando entre 36,54% e 45,85%, com prevalência predominante do genótipo PCV2d (24,14%). A prevalência de PCV3 foi de 14,49% no soro de matrizes e de aproximadamente 9% em demais amostras. Foi observada uma baixa frequência de coinfeção entre o PCV2 e o PCV3, e a confirmação da eficácia do fluido oral como alternativa diagnóstica. Esses resultados fornecem informações para subsidiar a definição de estratégias de prevenção e controle das infecções por PCV2 e PCV3 e monitoramento dessas infecções na produção suína da região da Zona da Mata em Minas Gerais.

Palavras-chave: *Porcine circovirus2*, *Porcine circovirus3*, PCV2d, Circovirose, qPCR, nested PCR.

## ABSTRACT

Members of the *Circoviridae* family are among the smallest known viruses, with four species identified so far: PCV1, PCV2, PCV3, and more recently, PCV4. This study investigates the genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) in samples from the Zona da Mata Mineira region, Brazil. A total of 467 samples were analyzed, consisting of 138 serum samples from sows and 329 serum and oral fluid samples from vaccinated pigs of various ages, collected in nine farrow-to-finish farms, located in the micro-regions of Viçosa and Ponte Nova. PCV2 detection was performed by quantitative real-time PCR (qPCR), while PCV3 was detected by nested PCR. Positive samples for PCV2 in the qPCR test underwent conventional PCR for genotyping. Samples were categorized by age group, with 138 samples from sows, 116 samples from piglets in the nursery phase, 109 pigs in the rearing phase, and 104 pigs in the finishing phase. Additionally, a questionnaire focused on biosafety and vaccination was administered to producers. The results indicated a low proportion of positive samples in all production stages. Positivity was null in the serum of sows and ranged between 5.78% and 17.31% in serum and oral fluid samples from growing animals. The majority of samples showed viral load corresponding to subclinical presentation, ranging between 36.54% and 45.85%, with a predominant prevalence of PCV2d genotype (24.14%). The prevalence of PCV3 was 14.49% in sow serum and approximately 9% in the remaining samples. A low frequency of co-infection of PCV2 and PCV3 was observed, and the efficacy of oral fluid as a diagnostic alternative to detected PC2 and PCV3 in the conditions of this study was confirmed. These findings provide insights for the development of strategies for preventing, controlling and monitoring these diseases in swine production of the Zona da Mata, Minas Gerais.

Keywords: *Porcine circovirus2*, *Porcine circovirus3*, PCV2d, Circovirus, qPCR, nested PCR.

---

**Lista de Figuras**

---

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1 -</b> | Organização do genoma do Circovírus suíno. Fonte: Maity <i>et al.</i> , 2023.  | 16 |
| <b>Figura 2 -</b> | Distribuição mundial das espécies de circovírus suíno e genótipos de PCV2. Fonte: Maity <i>et al.</i> , 2023.  | 19 |
| <b>Figura 3 -</b> | Distribuição mundial do PCV3. Fonte: Turlewicz-Podbielska <i>et al.</i> , 2022.  | 20 |
| <b>Figura 4 -</b> | Pneumonia intersticial (A). Enterite granulomatosa (B). Pontos brancacentos no rim (C). Síndrome da dermatite e nefropatia, observando-se áreas de hemorragia associadas à vasculite (D). Fonte: Imagens cedidas por Bruno Broggio, médico-veterinário.  | 23 |
| <b>Figura 5 -</b> | Linfonodos superficiais inguinais aumentados de tamanho, antes da necrópsia (A) e depois da necrópsia (B). Fonte: Imagens cedidas por Bruno Broggio, médico-veterinário.   | 24 |
| <b>Figura 6 -</b> | Patogenia das infecções pelo PCV2. Fonte: Flores, Lima & Zanella, 2022.  | 25 |
| <b>Figura 7 -</b> | Mapa político do Estado de Minas Gerais com a localização das granjas onde as coletas foram realizadas. IBGE 2024. Elaborado por: Ailton Costa, 2024.  | 31 |
| <b>Figura 8 -</b> | Coleta de sangue em fossa jugular de uma matriz suína (A). Coleta de sangue em fossa jugular de um suíno em fase de recria (B).  | 32 |
| <b>Figura 9 -</b> | Corda posicionada na baia, na altura do dorso dos leitões em fase de creche (A). Parte molhada da corda dentro de saco plástico (B). Fluido oral extraído da corda em saco plástico (C). Fluido oral em tubo Falcon devidamente identificado pronto para o armazenamento e envio ao laboratório (D). | 34 |

---

**Lista de Tabelas**

---

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Tabela 1 -</b> | Resumo de sinais clínicos e lesões mais frequentes do PCV2. Fonte: Adaptado de Segalés (2012).   | 21 |
| <b>Tabela 2 -</b> | Relação de amostras coletadas de acordo com o tipo de amostra e categoria animal.  | 32 |
| <b>Tabela 3 -</b> | Relação de quantidade de amostras coletadas em matrizes, de acordo com a ordem de parto.   | 33 |
| <b>Tabela 4 -</b> | Quantificação da carga viral em cópias genômicas de DNA/mL de soro.  | 37 |
| <b>Tabela 5 -</b> | Resultados segregados por granjas analisadas e tipos de amostra, abrangendo as fases de creche, recria e engorda (CRE), além do soro de matrizes suínas (M). | 41 |
| <b>Tabela 6 -</b> | Resultados das análises de PCR para detecção de PCV2 e PCV3, por tipo de amostra analisada, em cada categoria animal.  | 46 |
| <b>Tabela 7 -</b> | Detalhes da vacinação contra PCV2 nas diferentes granjas amostradas.   | 48 |
| <b>Tabela 8 -</b> | Informações sobre biossegurança das granjas amostradas no estudo, com foco na entrada de pessoas e animais.  | 50 |
| <b>Tabela 9 -</b> | Distribuição de amostras genotipadas e resultados para PCV2a, PCV2b, PCV2d e coinfeção entre PCV2d e PCV3.   | 51 |

---

**Lista de Gráficos**

---

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Gráfico 1 -</b> | Resultados das amostras consideradas positivas por PCR de soro de matrizes para PCV2 e PCV3, classificados por granja.       | 43 |
| <b>Gráfico 2 -</b> | Resultados de amostras de soro consideradas positivas para PCV2 e PCV3 nas porcas amostradas, agrupadas pela ordem de parto. | 44 |

---

**Lista de Anexos**

---

- Anexo 1 -** Questionário abrangente aplicado aos produtores de suínos, enfatizando práticas de biossegurança e 61 vacinação.

---

**Lista de Abreviaturas**

---

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal  
bp - Pares de base  
CDRS - Complexo das doenças respiratórias dos suínos  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Ct - Limiares de ciclo  
gc – Cópias genômicas  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
dNTPs - Desoxinucleotídeos Trifosfato  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EUA - Estados Unidos da América  
G1 - Granja 1  
GPD - Ganho de peso diário  
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral  
IFN- $\alpha$  - Interferon alfa  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama  
IHC – Imunohistoquímica  
ISH - Hibridização in situ  
kb – Quilobyte  
LEV - Baixo volume de eluição  
LPVA - Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal  
MDA - Anticorpos derivado materno  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio  
mL - Mililitro  
mM-Micromolar  
mm – Milímetros  
NA - Anticorpos neutralizantes  
ORF - Sequência aberta de leitura  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PCV - *Circovirus porcine*  
PCV2-SI - Infecção subclínica por PCV2  
PCV3-RD - Doença reprodutiva do PCV3  
PCV3-SD - Doença sistêmica do PCV3  
PCVAD - Doenças Associadas ao Circovírus Suíno  
qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa  
rpm - Rotação por minuto  
SDNS - Síndrome de dermatite e nefropatia suína  
SMDS - Síndrome multissistêmica do de finhamento pós-desmame  
TAE - Tris-Acetato-EDTA  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
UV – Ultravioleta  
 $\mu$ L – Microlitro

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2. Objetivos .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3. Revisão de literatura .....</b>  | <b>15</b> |
| 3.1. Etiologia.....  | 15        |
| 3.2. Epidemiologia.....  | 17        |
| 3.3. Patogênese, Sinais Clínicos e Lesões .....  | 20        |
| 3.4. Resposta imune .....  | 27        |
| 3.5. Diagnóstico.....  | 28        |
| 3.6. Prevenção e controle .....  | 29        |
| <b>4. Materiais e métodos .....</b>  | <b>30</b> |
| 4.1. Amostragem .....  | 30        |
| 4.2. Preparo das amostras.....   | 35        |
| 4.3. Extração .....  | 35        |
| 4.4. PCR em tempo real para detecção de PCV2 .....   | 35        |
| 4.5. Nested PCR para detecção de PCV3 .....  | 37        |
| 4.6. Eletroforese em gel para detecção da amplificação do gene ORF-2<br>do PCV3 .....                      | 38        |
| 4.7. Metodologia da PCR para genotipagem de PCV2 .....   | 38        |
| <b>5. Resultados e Discussões .....</b>  | <b>40</b> |
| 5.1. Detecção de PCV2 e PCV3 em amostras de soro e fluido oral .....                                       | 40        |
| 5.2. Genotipagem das amostras positivas para PCV2 .....  | 50        |
| 5.3. Coinfecção entre PCV3 e os diferentes genótipos de PCV2 .....   | 52        |
| 5.4. Avaliação do fluido oral como amostra biológica para diagnóstico da<br>infecção por PCV2 e PCV3 ..... | 53        |
| <b>6. Conclusões .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7. Referencias .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>8. ANEXOS.....</b>  | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A circovirose é uma enfermidade causada pelo *Circovirus porcine2*, pertencente à família *Circoviridae*, e foi descrito no Brasil pela primeira vez em 2000, pela equipe do Laboratório de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, SC. Estudos retrospectivos demonstraram a presença do PCV2 desde 1988 no país (Ciacci-Zanella; Morés, 2003).

A doença causada pela infecção pelo PCV2 está associada a distintas apresentações clínicas que podem causar altas perdas econômicas para a indústria suína (Nayar *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1998;). Uma das principais apresentações clínicas é a síndrome multissistêmica do deﬁnamento pós-desmame (SMDS), acometendo principalmente leitões entre cinco e 12 semanas de idade, embora a doença já tenha sido descrita em leitões com quatro a 24 semanas de idade (Zanella, 2012). Além da SMDS, falhas reprodutivas, síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDNS), o complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) e a enterite granulomatosa também estão associadas à infecção pelo PCV2 (Segalés, 2012).

Vale destacar que nem sempre a doença se manifesta na forma clínica, havendo muitos animais subclínicos na granja, o que contribui para a manutenção do PCV2 em granjas comerciais (Saporiti *et al.*, 2021).

A infecção pelo *Circovirus porcine3* (PCV3) está associada às falhas reprodutivas, com taxa alta de fetos mumificados, assim como com casos de dermatite suína e síndrome de nefropatia e periarterite (Arruda *et al.*, 2019; Dal Santo *et al.*, 2020). Foi relatada um potencial associação com doença respiratória e entérica (Zhai *et al.*, 2017). Em leitões neonatos foi descrita a apresentação clínica como dispneia, malformação auricular e fraqueza (Molossi *et al.*, 2022).

Compreendendo a importância da produção suína no Brasil e os desafios enfrentados em relação as apresentações clínicas, é fundamental direcionarmos nossa atenção para estes dois patógenos, que causam uma série de manifestações clínicas que podem comprometer a saúde e o bem-estar dos animais.

As técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de PCR em Tempo Real (qPCR), são amplamente aplicadas em pesquisa e diagnóstico. Estas técnicas são essenciais para a análise de uma variedade de alvos em diferentes

tipos de amostras (Bustin *et al.*, 2009). Neste estudo, conduzimos análises utilizando amostras de soro e fluido oral coletadas de matrizes e leitões em crescimento de diferentes faixas etárias. Compreender a prevalência e os padrões de circulação desses vírus é crucial para atenuar seus efeitos adversos na indústria suína. Dessa forma, este estudo não apenas visa caracterizar a presença desses vírus na região da Zona da Mata, mas também busca avaliar a eficácia de uma nova abordagem diagnóstica da infecção pelo PCV3, utilizando o fluido oral como amostra biológica. Espera-se que esses esforços contribuam para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e prevenção destes patógenos.

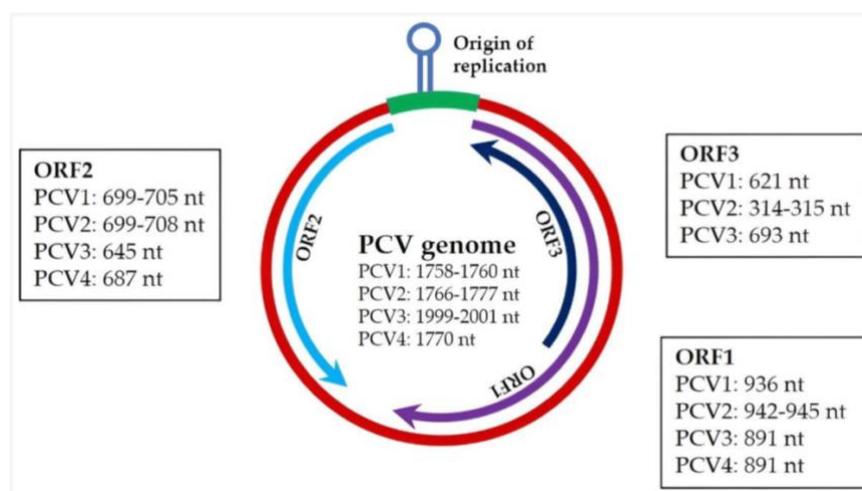
## 2. OBJETIVOS

- Detectar o PCV2 e o PCV3 em amostras de soro e de fluido oral coletadas na região da Zona da Mata Mineira no ano de 2023, pela técnica de PCR.
- Caracterizar geneticamente as amostras positivas para PCV2, classificando-as em genótipos já previamente estabelecidos.
- Entender a possibilidade de coinfeção entre PCV3 e os diferentes genótipos de PCV2.
- Avaliar a utilização de fluido oral como amostra biológica para diagnóstico da infecção por estes vírus.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Etiologia

O *Circovirus porcine2* (PCV2) e o *Circovirus porcine3* (PCV3) são membros pertencentes à família *Circoviridae* e ao gênero *Circovirus*, sendo vírus não envelopados, icosaédricos, de aproximadamente 17 nm de diâmetro, com DNA circular e fita simples, conforme representado na figura 1 (ICTV, 2024).



**Figura 1:** Organização do genoma do Circovírus suíno. Fonte: Maity *et al.*, 2023.

Os membros da família *Circoviridae* estão entre os menores vírus conhecidos, variando de 1,7 a 2kb (Meehan *et al.*, 1997; Palinski *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020)

Quatro espécies foram identificadas até o momento: PCV1, PCV2, PCV3 e mais recentemente, o PCV4. O *Circovirus porcine1* (PCV1) foi a primeira espécie a ser descrita, com 1759 nucleotídeos (Meehan *et al.*, 1997). Identificado em 1974 como um contaminante de células renais suínas PK-15, após várias avaliações, incluindo infecção experimental, chegou-se à conclusão de que o PCV1 não induz sinais clínicos em suínos (Tischer *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1995).

A descoberta de um novo antígeno e ácido nucleico semelhante ao PCV1, porém patogênico aos suínos resultou na descrição de uma nova espécie, sendo designada como PCV2 (Allan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998).

O PCV2 apresenta 1766-1777 nucleotídeos (Wei *et al.*, 2019). O genoma viral do PCV2 é composto por onze *open reading frames* (ORFs) que podem ser transcritos em diferentes proteínas. As regiões mais estudadas e sequenciadas são a ORF1 e a ORF2. A ORF1 codifica proteínas de replicação e a ORF2 codifica proteínas estruturais do capsídeo (Nawagitgul *et al.*, 2000). A ORF2 tem sido amplamente estudada, devido à variabilidade de seus nucleotídeos, que pode gerar domínios ou sítios diferentes envolvidos na interação do hospedeiro, sendo associada à patogenicidade do vírus (Nawagitgul, 2000; Franzo, 2016).

O PCV3 contém um genoma circular com 2000 nucleotídeos, e três *open reading frames* (ORFs), incluindo capsídeo, replicase e uma proteína de função

desconhecida (ORF3) (Palinski *et al.*, 2017). O sequenciamento e a análise metagenômica mostraram que o PCV3 é geneticamente distinto do PCV2, com apenas 48% de identidade de aminoácidos na proteína rep e 26% de identidade de aminoácidos na proteína cap entre os dois vírus (Phan *et al.*, 2016; Palinski *et al.*, 2017).

Em 2019 na região de Hunan, China, foi identificado um novo circovírus denominado *Circovirus porcine4* (PCV4), que contém o genoma circular com 1770 nucleotídeos e homologia entre 43,2% e 51,5% com os genomas de PCV1, PCV2 e PCV3 (ZHANG *et al.*, 2020). Um estudo retrospectivo revelou a presença de PCV4 em amostras de arquivo datadas de 2012, sugerindo que esse vírus circula na China há pelo menos uma década (Hou *et al.*, 2022). Além disso, o PCV4 foi detectado na Coreia (NGUYEN *et al.*, 2022) e, mais recentemente, foi identificada também a presença do PCV4 na Tailândia e na Europa, especificamente em javalis e porcos domésticos do Centro-Sudoeste da Espanha Holgado-Martín *et al.*, 2023; Sirisereewan *et al.*, 2023). Os pesquisadores observaram que é possível diferenciar o PCV4 em dois genótipos, PCV4a e PCV4b, com base na variação do resíduo de aminoácido na posição 212 do gene Cap (Sirisereewan *et al.*, 2023).

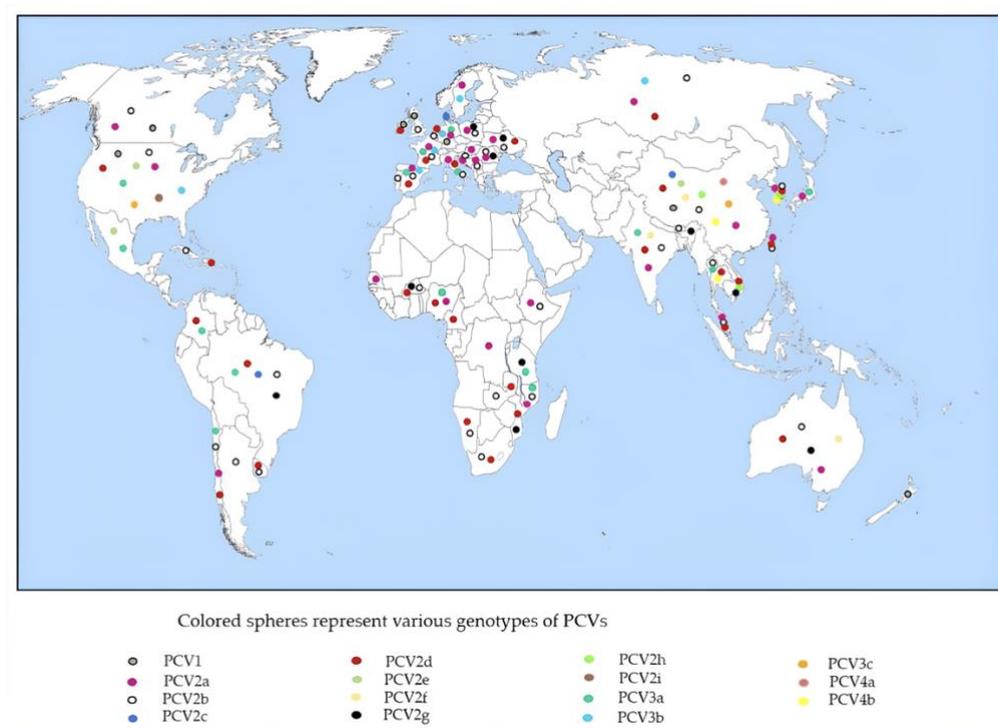
Este vírus foi detectado em quase todos os tecidos suínos, particularmente baço e linfonodos, em suínos com sinais respiratórios, entéricos, reprodutivos e em animais com síndrome da dermatite e nefropatia suína (Zheng *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). São necessários mais estudos para elucidar a patogenicidade do PCV4 (Holgado-Martín *et al.*, 2023).

A organização dos genomas das quatro espécies de circovírus suíno e seus respectivos tamanhos são demonstrados na Figura 1.

### 3.2. Epidemiologia

O PCV2 é considerado patogênico para os suínos, afetando de forma significativa os suínos domésticos e selvagens em todo o mundo (Segalés, 2012; Segalés *et al.*, 2013). Até o momento foram descritos nove genótipos do PCV2 (PCV2a-PCV2i) classificados com base nas sequências da região ORF2 do genoma, que corresponde ao capsídeo viral (Wang *et al.*, 2020). O PCV2 é caracterizado por uma alta taxa de mutação e é esperado que ocorram novas atualizações e mudanças na evolução viral, o que pode ter um impacto significativo na classificação dos genótipos no futuro (Franzo; Franco, 2020).

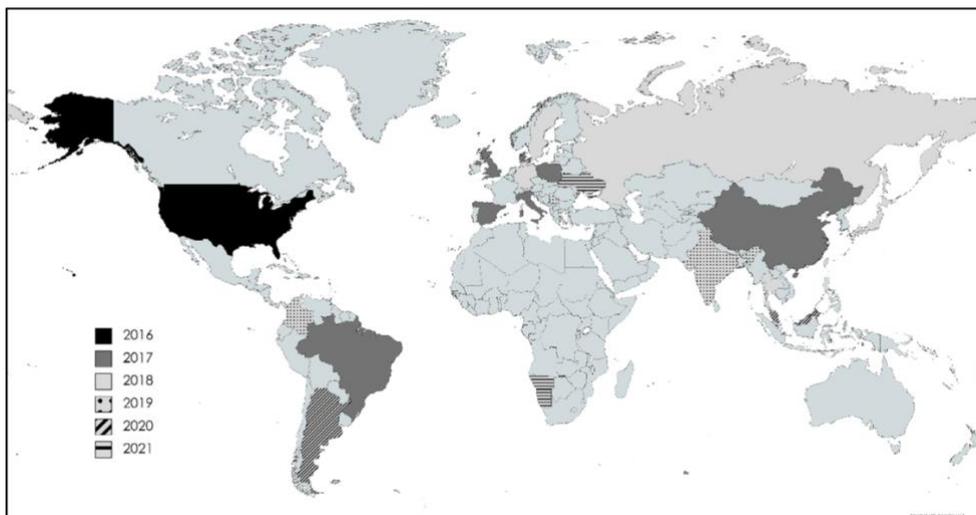
Desde a primeira descrição do PCV2, foram relatadas duas grandes mudanças na frequência de genótipos circulantes de PCV2, as chamadas "mudanças de genótipo" (Karuppannan & Opriessnig, 2017; Opriessnig *et al.*, 2020). Inicialmente, PCV2a foi considerado o mais frequente até meados de 2003, quando PCV2b se tornou o genótipo mais disseminado, supostamente associado a maior virulência desse agente (Dupont *et al.*, 2008, Segalés *et al.*, 2013). Nos últimos anos, o PCV2d se tornou o mais prevalente em importantes regiões produtoras de suínos, como Estados Unidos, Europa, China, Coreia do Sul e América do Sul (Franzo *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2017). No entanto, em 2015, em um estudo retrospectivo realizado na Suíça, foi encontrado DNA correspondente ao genótipo PCV2d em amostras armazenadas desde 1998 (Xiao; Halbur; Opriessnig, 2015). O genótipo PCV2c foi detectado em amostras de tecidos parafinizados de um banco dinamarquês coletadas entre 1980 e 1990 (Dupont *et al.*, 2008) e em suínos selvagens no Pantanal brasileiro (Franzo *et al.*, 2015), assim como em suínos domésticos na China (Liu *et al.*, 2016). O genótipo PCV2e é o mais recente e emergente no sul da China (Franzo; Segalés, 2018; XU *et al.*, 2022). Os demais genótipos, PCV2f, PCV2g e PCV2h, compreendem clados menores, presentes em áreas pontuais e provavelmente de menor importância (Xiao *et al.* 2012; Sibila *et al.*, 2021). Recentemente, um novo genótipo designado como PCV2i foi descrito nos Estados Unidos (Wang *et al.*, 2020). Os genótipos PCV2a, PCV2b e PCV2d estão distribuídos mundialmente e são associados a impactos econômicos negativos nas propriedades onde ocorrem, sendo o PCV2d atualmente o mais prevalente (Franzo; Segalés, 2020). A distribuição mundial das espécies de circovírus suíno e dos genótipos de PCV2 são demonstrados na Figura 2.



**Figura 2** - Distribuição mundial das espécies de circovírus suíno e genótipos de PCV2. Fonte: Maity *et al.* 2023.

O PCV3 teve seu primeiro relato na Carolina do Norte (EUA) no ano de 2015 em leitões de duas a 10 semanas de idade com alterações cardíacas e inflamação multissistêmica. Sua detecção ocorreu pelo método de sequenciamento metagenômico (Phan *et al.*, 2016). Foram relatadas também ocorrências de PCV3 no mesmo ano em fetos abortados de porcas com sinais semelhantes à Síndrome de Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS). Alguns tecidos dessas porcas foram submetidos à análise de imuno-histoquímica, na qual também foi identificado o PCV3 (Palisnki *et al.*, 2017).

No Brasil, uma análise retrospectiva (2006 e 2007) de amostras de tecidos de suínos revelou a presença do PCV3 em todos os estados produtores de suínos (Saraiva *et al.*, 2019). O DNA de PCV3 foi detectado em amostras agrupadas de soro de porcas com problemas reprodutivos através de análise por PCR (Tochetto *et al.*, 2018). Por meio de análise por qPCR, a presença do DNA do PCV3 foi identificada em diversos tecidos em animais de diferentes faixas etárias incluindo porcas (Assao *et al.*, 2021), mostrando que o PCV3 é disseminado por todo o Brasil (Saraiva *et al.*, 2019; Assao *et al.*, 2021;). A distribuição mundial do PCV3 é demonstrada na Figura 3.



**Figura 3** - Distribuição mundial do PCV3. Fonte: *Turlewicz-Podbielska et al., 2022*.

Em um estudo na China, foi proposto que mutações nos aminoácidos 24 e 27 da proteína *cap* poderiam ser potenciais marcadores moleculares para classificar o PCV3 em três clados: PCV3a, PCV3b e PCV3c, estando o PCV3a dividido em três subclados (PCV3a1, PCV3a2 e PCV3a3) com base na relação evolutiva e outras características moleculares da proteína *cap* (Fu *et al.*, 2018). Porém, com base na distância genética máxima e a relação próxima destas outras amostras com o PCV3a, foi reforçado em um trabalho recente a importância de seguir os critérios de classificações preservando a informação de que todas as sequências apresentadas anteriormente seriam unicamente do genótipo PCV3a (Franzo; Segalés, 2023).

### 3.3. Patogênese, Sinais Clínicos e Lesões

Os circovírus requerem células em divisão ativa para replicação em culturas celulares e *in vivo* (Tischer *et al.*, 1987). A extensa replicação em embriões leva à morte e reabsorção no útero (Mateusen *et al.*, 2007). A replicação no coração resulta em insuficiência cardíaca e morte do feto, o qual irá apresentar um processo de mumificação, se não for abortado (Pensaert *et al.*, 2004). Após a infecção em estágios posteriores do desenvolvimento fetal, a replicação diminui consideravelmente com o aumento da idade do feto devido à presença de uma resposta imune humoral adaptativa do feto e à redução da taxa de mitose durante

a gestação (Gassmann *et al.*, 1988). Após o nascimento, o PCV2 perde seu tropismo para as células cardíacas e se concentra principalmente em linfoblastos e macrófagos (Wang *et al.*, 2020).

A infecção pelo PCV2 é mais comumente manifestada como a síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame (Allan *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1998; Nayar *et al.*, 1997). Esta condição afeta leitões entre cinco e 12 semanas de idade, embora casos já tenham sido descritos em leitões de quatro a 24 semanas de idade (Zanella, 2012). Também estão associadas à infecção, falhas reprodutivas, síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDNS), o complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) e a enterite granulomatosa, como detalhado na Tabela 1 (Segalés, 2012).

**Tabela 1:** Resumo de sinais clínicos e lesões mais frequentes do PCV2. Fonte: Adaptado de Segalés (2012).

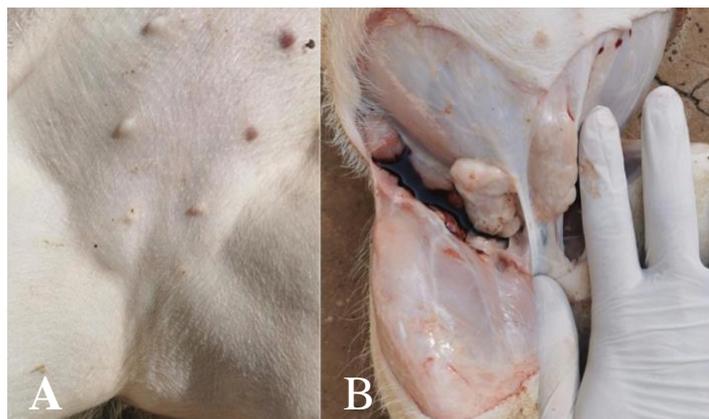
| Terminologia  | Sinais clínicos e lesões  |
|---|---|
| Infecção subclínica por PCV2 (PCV2-SI)                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução de ganho de peso diário (GPD) e sem sinal clínico evidente</li> <li>• Nenhuma ou mínima lesão histopatológica nos tecidos (principalmente linfoides)</li> <li>• Baixa quantidade de PCV2 em poucos tecidos (linfoides)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- A técnica preferencial de diagnóstico neste caso deve ser o qPCR</li> </ul> </li> </ul>                        |
| Síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame (SMDS) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelagem áspera e longa</li> <li>• Espinha dorsal proeminente e cabeça relativamente grande</li> <li>• Aumento do linfonodo inguinal (ilustrado na figura 5)</li> <li>• Perda de peso e palidez da pele (sinais clínicos respiratórios e/ou digestivos também podem estar presentes)</li> <li>• Depleção de linfócitos moderada a grave com inflamação granulomatosa dos tecidos linfoides</li> </ul> |

|   |  |
|---|--|
|   | <p>(também em outros tecidos)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantidade moderada a alta de PCV2 em tecidos que apresentam lesões associadas à infecção pelo PCV2</li> </ul>  |
| Complexo de doenças respiratórias (CDRS)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinais clínicos respiratórios (dispneia)</li> <li>• Pneumonia intersticial (demonstrada na figura 4ª) ou bronco-intersticial linfo-histiocítica a granulomatosa, bronquiolite necrosante a ulcerativa leve a grave</li> <li>• Quantidade moderada a alta de PCV2 no pulmão</li> </ul>   |
| Enterite associada ao PCV2                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarreia</li> <li>• Enterite granulomatosa (observada na figura 4B)</li> <li>• Mucosa intestinal espessada</li> <li>• Aumento dos linfonodos mesentéricos</li> <li>• Quantidade moderada a alta de PCV2 na mucosa intestinal</li> </ul>   |
| Falha reprodutiva associada ao PCV2             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Falha reprodutiva no final da gestação</li> <li>• Abortos ou mumificações</li> <li>• Miocardite fibrosa a necrosante de fetos</li> <li>• Ascite, hidrotórax e hidropericárdio em fetos</li> <li>• Quantidade moderada a alta de PCV2 no coração</li> <li>• Retorno regular ao estro</li> </ul>  |
| Síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDND) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pápulas e máculas na pele, principalmente nos membros e na área perineal (demonstradas na figura 4D)</li> <li>• Lesões cutâneas hemorrágicas e necrotizantes e /ou rins aumentados de volume e pálidos com petéquia cortical generalizada (visualizadas na figura 4C)</li> <li>• Linfonodos aumentados, principalmente inguinais</li> </ul> |

A doença também se manifesta na forma subclínica, podendo ser caracterizada pela redução do ganho de peso médio diário sem apresentar sinais clínicos evidentes (Segalés, 2012; Saporiti *et al.*, 2021). O desenvolvimento de PCVAD é multifatorial e nem todo suíno infectado pelo PCV2 irá desenvolver a doença clínica, uma vez que a interação do vírus com o hospedeiro, coinfeção com outros patógenos e modulação imunológica são considerados cofatores para a ocorrência da doença clínica (Opriessinig; Meng; Halbur, 2007).



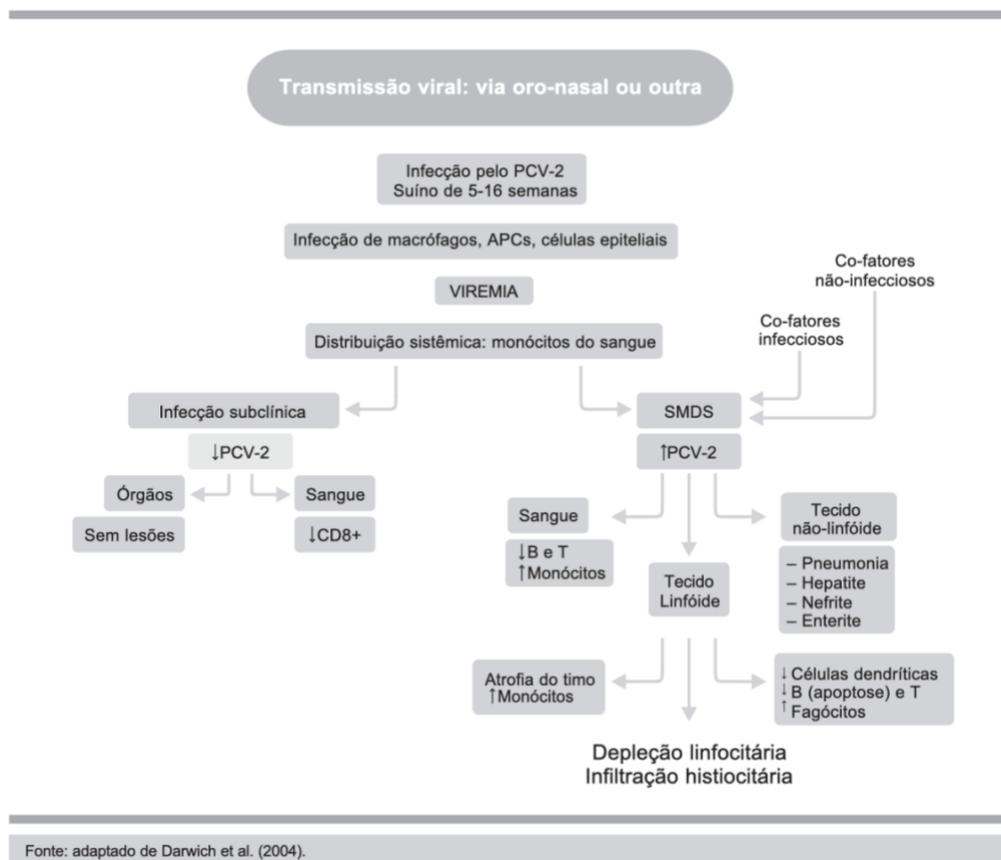
**Figura 4:** Pneumonia intersticial (A). Enterite (B). Pontos brancacentos no rim (C). Síndrome da dermatite e nefropatia, observando-se áreas de hemorragia (D). Fonte: Imagens cedidas por Bruno Broggio, médico-veterinário.



**Figura 5:** Linfonodos superficiais inguiniais aumentados de tamanho, antes da necropsia (A) e depois da necropsia (B). Fonte: Imagens cedidas por Bruno Broggio, médico-veterinário.

O PCV2 pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical, e o contato direto via oro-nasal é reconhecido como a principal via de infecção natural entre suínos (Segalés, 2012). O vírus pode ser eliminado através de secreções orais, nasais e oculares, além de fezes, urina, leite, sêmen e colostro, o que facilita a disseminação do vírus (Rose *et al.*, 2012; Segalés, 2012; Dvorak *et al.*, 2013). A transmissão também pode ocorrer por via transplacentária. Em casos de leitões que inicialmente não sejam infectados por via transplacentária, esses podem ser infectados pela mãe pelas outras formas de transmissão, citadas acima (Dvorak *et al.*, 2013).

É bem estabelecido que animais que apresentam infecção subclínica geralmente possuem uma carga viral inferior em comparação àqueles que desenvolvem SMDS, conforme apresentado na Figura 6. Além disso, é observado que esses animais tendem a desenvolver níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes contra o PCV2. Do ponto de vista clínico, a variação significativa no número de animais infectados por lote pode ser atribuída a três fatores principais: o efeito individual, o efeito da leitegada e o efeito do manejo, devido aos fatores de risco (Flores, Lima & Zanella, 2022).



**Figura 6:** Patogenia das infecções pelo PCV2. Fonte: Flores, Lima & Zanella, 2022.

O PCV3 é associado a falhas reprodutivas, aumento do percentual de fetos mumificados, assim como quadros de síndrome de dermatite, nefropatia e periarterite (Arruda *et al.*, 2019; Dal Santo *et al.*, 2020). Pode também estar associados a quadros de doenças respiratória e entérica (Zhai *et al.*, 2017). Em leitões neonatos foi descrita a apresentação clínica de dispneia, malformação da orelha e fraqueza (Molossi *et al.*, 2022).

Um estudo sobre a dinâmica de infecção por PCV3 em suínos saudáveis amostrados longitudinalmente mostrou a positividade em suínos de todas as idades, porém neste trabalho não foram analisadas amostras de soro de animais adultos (Klaumann *et al.*, 2019). Outros trabalhos também abordam a positividade de PCV3 em suínos de todas as fases de produção (Phan *et al.*, 2016), tais como leitões natimortos, porcas sem sinais clínicos de infecção (Zheng *et al.*, 2017), assim como em fetos abortados de porcas positivas e com sinais de PNDS (Palinski *et al.*, 2017). A positividade em animais com distúrbios reprodutivos tanto

no período pré e pós desmame, foi confirmada, podendo estar associada a sinais clínicos ou não (Saporiti *et al.*, 2021).

Microscopicamente, em infecções pelo PCV3, a principal característica apresentada é a vasculite multisistêmica caracterizada por linfócitos e células plasmáticas que se infiltram na parede dos vasos, pneumonia intersticial linfohistiocítica, miocardite e encefalite (Molossi *et al.*, 2022).

A malformação da orelha é uma característica consistente observada em animais positivos, com a hipótese de que esse achado pode estar relacionado à fase gestacional em que a viremia ocorreu, sendo que alguns animais com esta característica foram negativos no PCR (Molossi *et al.*, 2022). A capacidade uterina insuficiente e nutrição materna inadequada são dois principais fatores que prejudicam o crescimento fetal (WU *et al.*, 2006). São necessários mais estudos para entender a relação entre orelhas grandes e giradas caudalmente, e a infecção por PCV3 (Molossi *et al.*, 2022). A presença do genoma do PCV3 em um animal doente não implica que esse vírus seja a causa dos sinais clínicos ou lesões observadas (Saporiti *et al.*, 2021).

Na China, a análise por qPCR para detecção de PCV3 em diferentes tecidos de leitões clinicamente diagnosticados com tremores congênitos possibilitou a inferência de um possível papel do PCV3 como causa dos tremores congênitos, devido à observação de um maior número de cópias genômicas encontrados no cérebro e coração, possivelmente associadas aos sinais neurológicos (Chen *et al.*, 2017). Diferentemente do que foi observado neste estudo sobre PCV3, alguns trabalhos não sugerem a associação entre o PCV2 e esta condição clínica congênita. Entretanto, este ainda é um ponto controverso entre alguns pesquisadores (Kennedy *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2005).

Devido às várias apresentações clínicas associadas à infecção pelo PCV3, foi sugerido o termo PCV3-SD para doença sistêmica, e PCV3-RD para doença reprodutiva (Saporiti *et al.*, 2021). O PCV3-SD em tem sido pouco diagnosticado em suínos de crescimento até o momento (Arruda *et al.*, 2019; Williamson *et al.*, 2021). Já o PCV3-RD parece ocorrer com maior frequência (Arruda *et al.*, 2019; Saporiti *et al.*, 2021; Williamson *et al.*, 2021).

### 3.4. Resposta imune

A principal defesa do sistema imunológico inato contra infecções virais é a produção de interferons tipo I, como o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), que desempenha um papel crucial na inibição da replicação viral. Essa resposta também estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B específicos para antígenos (Abbas *et al.*, 2015).

A resposta imune humoral combate microrganismos ao conectar anticorpos a eles, inibindo sua habilidade de infectar células. Os níveis de anticorpos neutralizantes (NA) estão intimamente ligados à proteção do animal (Meerts *et al.*, 2006). Muitos dos sinais clínicos associados à infecção por PCV2 sugerem a presença de disfunção imunológica.

Meerts e colaboradores (2005) mostraram que os níveis de replicação viral se correlacionaram com a existência de diferentes padrões de respostas adaptativas à infecção por PCV2. Assim, os suínos com altas títulos de NA e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que é produzido principalmente por células T citotóxicas e células natural killer (NK), apresentaram os níveis mais baixos de replicação viral, enquanto suínos com respostas fracas ou nulas de NA e IFN- $\gamma$  tiveram os mais altos níveis de replicação viral.

A imunidade mediada por células, liderada pelos linfócitos T, combate microrganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias, que se multiplicam dentro das células hospedeiras. Essa resposta imune destrói os microrganismos dentro dos fagócitos ou induz a morte das células infectadas para eliminar os reservatórios de infecção (Abbas *et al.*, 2015).

Conforme ilustrado na Figura 6, que exemplifica a patogenia da infecção por PCV2, as lesões estão intimamente ligadas à diminuição dos níveis de linfócitos B e T no sangue (leucopenia), à redução desses tipos celulares nos órgãos linfoides e ao aumento de monócitos e macrófagos no sangue e nos órgãos linfoides, respectivamente. Essas mudanças nas populações celulares do sistema imunológico tanto no sangue quanto nos órgãos sugerem que nos animais afetados com SMDS há uma dificuldade em montar uma resposta imunológica adequada (Segalés *et al.*, 2004). Dessa forma, os anticorpos são essenciais na prevenção de infecções antes que se estabeleçam, sendo a produção eficaz desses anticorpos o principal objetivo da vacinação (Abbas *et al.*, 2015).

### 3.5. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo envolve a avaliação clínica e a avaliação dos índices produtivos (Segalés, 2012), associadas à observação de lesões macro e microscópicas em órgãos afetados, como linfonodos, baço, pulmões, fígado, coração, rins e intestinos, além da presença do vírus em tecidos linfoides. A detecção do antígeno viral ou do DNA viral nas lesões também é de grande importância (Segalés & Domingo, 2002). Dito isto, existem técnicas para detecção do antígeno ou ácido nucleico em tecidos ou células infectadas por PCV2 e/ou PCV3 como a imuno-histoquímica (IHC) e a hibridização *in situ* (ISH), respectivamente. Ambas as técnicas possibilitam uma avaliação da presença de células infectadas observadas em áreas que apresentem lesões histopatológicas sugestivas da infecção (Rosell *et al.*, 1999).

A técnica de PCR é utilizada para detectar o genoma viral, tanto de PCV2, como de PCV3, em animais infectados, sendo uma metodologia rápida e altamente sensível. Ela pode ser aplicada em amostras como soro, fluidos e tecidos (Caprioli *et al.*, 2006). Para garantir a eficiência da reação de PCR, diversos parâmetros devem ser cuidadosamente ajustados, como a concentração de DNA polimerase, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>, bem como a determinação adequada das temperaturas e duração das etapas de desnaturação, anelamento e extensão. Além disso, o número de ciclos de amplificação e a presença de inibidores deve ser cuidadosamente avaliada e minimizada (Sachse, 2003).

O ácido nucleico ou antígeno do PCV2, presentes em lesões de suínos infectados, são os principais alvos para o diagnóstico de infecção ou de doenças relacionadas ao PCV2 em suínos (Mcintosh *et al.*, 2009). A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica que permite a detecção quantitativa das cópias genômicas de PCV2 e PCV3, facilitando a correlação entre a carga viral e a manifestação de sinais clínicos e lesões causadas por esses vírus (Zhao *et al.*, 2010).

A nested PCR usa dois conjuntos de primers e duas etapas sequenciais de amplificação, em que o produto da primeira amplificação serve como molde para a segunda (Sachse, 2003; Green & Sambrook, 2019). Esta técnica propicia a diminuição da ação de inibidores, que interferem na eficácia da PCR convencional em amostras clínicas, aumentando a sensibilidade da detecção de alvos genéticos, mesmo em baixas concentrações. A segunda etapa é uma continuação da primeira reação, mas com quantidades significativamente reduzidas do produto

inicial e que minimiza a competição entre sequências de DNA, aumentando eficiência e sensibilidade na detecção do alvo (Sachse, 2003).

### 3.6. Prevenção e controle

A principal medida preventiva contra o PCV2 é a vacinação. Desde 2008, quando os rebanhos brasileiros começaram a ser imunizados (Zanella, 2017), as vacinas contra o PCV2 têm demonstrado consistentemente sua eficácia. Elas não apenas impedem o surgimento de sinais clínicos, mas também reduzem a viremia, a excreção viral e as lesões associadas, promovendo uma resposta imunológica eficaz, tanto humoral quanto celular (Franzo; Segalés, 2020).

Esquemas de vacinação contra o PCV2 em leitões entre 3-4 semanas são os mais frequentes (Oliver-Ferrando *et al.*, 2016), idade em que é esperada a diminuição da resposta imune passiva, adquirida via colostro. Altos níveis de anticorpos derivados maternos (MDA) no momento da vacinação podem causar uma menor resposta imunológica devido à interferência com a soroconversão provocada pela vacina (Fraile *et al.*, 2012).

A vacinação massal ou periódica de porcas durante a gestação ou lactação contra o PCV2 tornou-se uma prática comum em granjas comerciais. Isso visa homogeneizar a imunidade do rebanho e reduzir o impacto de doenças associadas à infecção pelo PCV2 (Poulsen Nautrup *et al.*, 2021; Pérez *et al.*, 2023), através de uma resposta humoral robusta devido às altas concentrações de anticorpos colostrais homogêneos (Fraile *et al.*, 2012; Sibila *et al.*, 2013).

Atualmente várias vacinas comerciais contra PCV2 estão disponíveis no Brasil, sendo produzidas, em sua maioria, com base no genótipo PCV2a ou em sua proteína de capsídeo. Algumas vacinas utilizam os genótipos PCV2b ou PCV2d como antígeno vacinal (Franzo; Segalés, 2020).

Vários estudos têm demonstrado que vacinas baseadas no genótipo PCV2a oferecem proteção cruzada a animais desafiados com PCV2b. Três vacinas comerciais de dose única de PCV2a mostraram-se eficazes no controle da infecção concomitante por PCV2b em suínos, reduzindo a viremia e as lesões linfoides associadas sob condições de campo (Jeong *et al.*, 2015). Outro estudo demonstrou que ambas as vacinas baseadas em PCV2a ou PCV2b reduziram ou impediram significativamente a viremia detectável de PCV2b (Opriessnig *et al.*, 2014). Um experimento desenvolvido na Coreia demonstrou que a vacina contra

PCV2 baseada em PCV2a foi capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes cruzados contra PCV2a, PCV2b e PCV2d (PARK *et al.*, 2019).

A administração incorreta da vacina, em animais com imunossupressão, e com a presença de infecções concomitantes, pode comprometer a eficácia da vacina na indução de uma resposta imune ativa, exacerbando a limitação da proteção fornecida pela vacinação (Franzo; Segalés, 2020).

O aumento do estresse no animal pode levar ao aumento dos níveis séricos do hormônio cortisol, associado ao estresse (Patterson *et al.*, 2015). Efeitos combinatórios de fatores como redução da pressão de infecção nos rebanhos por meio de práticas aprimoradas de higiene e gerenciamento; minimização da superlotação em baias onde há animais infectados que já estejam na baia; e diminuição de estressores ambientais como ventilação inadequada, variação de temperatura, mistura de lotes de diferentes idades, ruídos e transporte inadequado; podem minimizar os efeitos destes fatores na supressão do sistema imunológico do animal, e assim, diminuir a susceptibilidade para PCVAD (Madec *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2012; Patterson *et al.*, 2015). Estes pontos são importantes não só para controlar e minimizar a disseminação do PCV2, mas também do PCV3, sendo que, até o momento, não há vacina disponível contra esse patógeno (Maity *et al.*, 2023).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

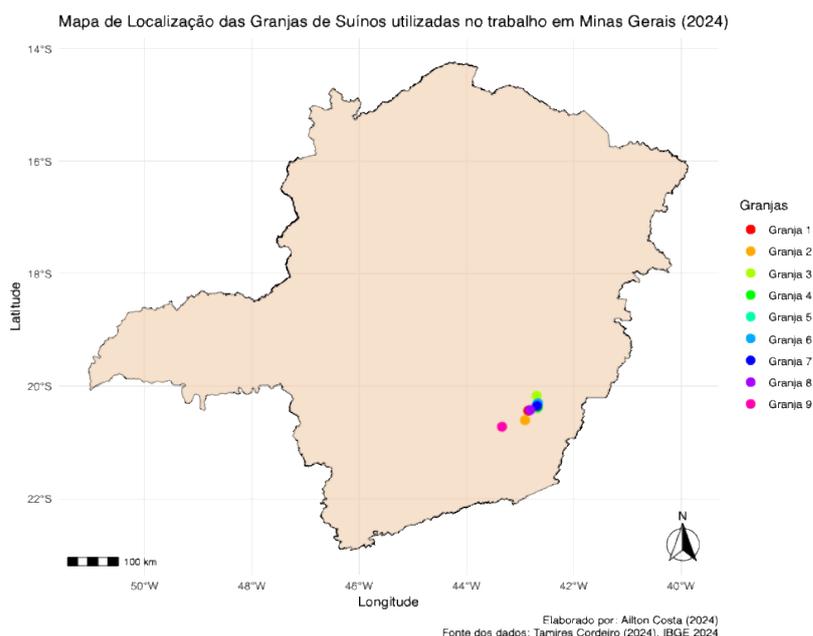
### **4.1. Amostragem**

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram previamente consentidos pelos proprietários das granjas através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e com o número 297/24 referente à submissão deste trabalho à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

O cálculo do tamanho da amostra necessário para a definição de prevalência com um nível de confiança e precisão foi estimado a partir da Calculadora Epidemiológica Epitools®, sendo considerada a prevalência esperada de positividade média de PCV2 e PCV3 em 70% nos rebanhos e a especificidade do teste de 90%, a sensibilidade de 93%, o erro de 5% e o nível de confiança em 95%. Considerando esses parâmetros, foi determinado um “n” amostral de 467 amostras de soro e de fluido oral a serem coletados neste trabalho (“Epitools - Epidemiological Calculators”, 2022).

A determinação das amostras a serem coletadas para o projeto foi baseada na seleção das amostras previamente utilizadas para o diagnóstico de infecções por PCV2 e PCV3 no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da Escola de Veterinária da UFMG. Estas amostras são frequentemente empregadas na rotina de prestação de serviços.

A coleta de amostras para o projeto foi conduzida em nove granjas de ciclo completo localizadas nas microrregiões de Viçosa e Ponte Nova, situadas na Zona da Mata de Minas Gerais, conforme demonstrado na figura 7.

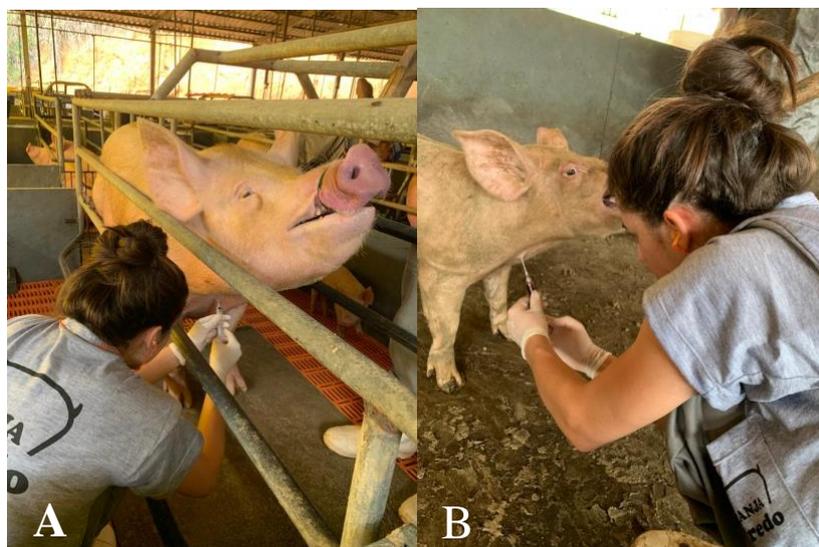


**Figura 7:** Mapa político do Estado de Minas Gerais com a localização das granjas onde as coletas foram realizadas. IBGE 2024. Elaborado por: Ailton Costa, 2024.

A seleção das nove granjas ocorreu com base em critérios relacionados à sua localização, coletando amostras em sete cidades distintas, abrangendo granjas que possuíam entre 280 e 1600 matrizes. Apenas a granja G6 apresentava ausência de infecção por *Mycoplasma spp* nos animais alojados. Todas as granjas eram de ciclo completo e apresentavam positividade para PCV2, de acordo com levantamentos prévios. Elas utilizavam vacinas como medida de prevenção e controle do PCV2. Dentre as vacinas comerciais, as utilizadas nas granjas foram: Circovac®, Circumvent® PCV-M, Ingelvac CircoFLEX®, Porcilis® PCV M Hyo e a vacina SafeSui®. Nenhuma das granjas selecionadas tinha

confirmação de circulação de PCV3 previamente, por meio de coleta de amostras e diagnóstico laboratorial.

As amostras coletadas incluíram soro de matrizes com diferentes ordens de partos e amostras de sangue e fluido oral de animais em crescimento (Figura 8).



**Figura 8:** Coleta de sangue em fossa jugular de uma matriz suína (A). Coleta de sangue em fossa jugular de um suíno em fase de recria (B).

Na Tabela 2, foram relacionados a quantidade e o tipo de amostras coletadas de cada categoria animal, sendo animais com 6, 9 e 13 semanas de idade, nas fases de creche, recria e engorda, respectivamente. A relação de ordem de parto de cada matriz amostrada para a presente pesquisa é apresentada na Tabela 3.

**Tabela 2:** Relação de amostras coletadas de acordo com o tipo de amostra e categoria animal.

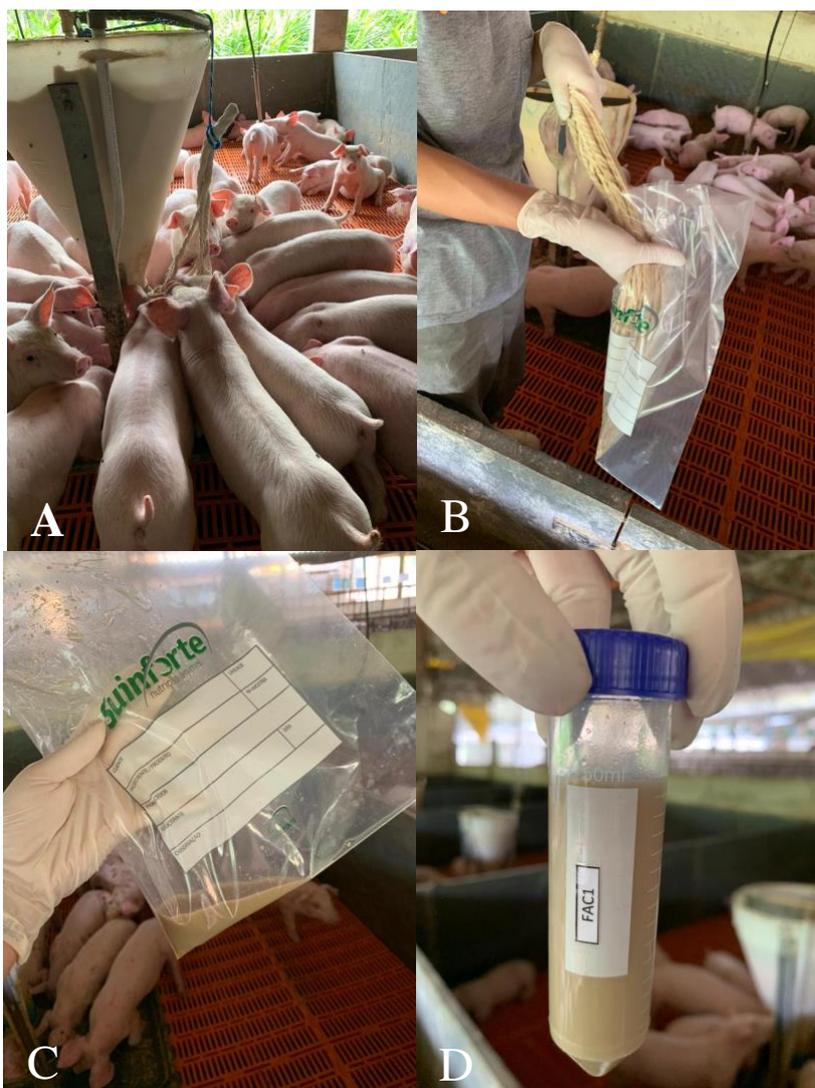
| <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Categoria Animal</b> | <b>Quantidade</b> |
|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Fluido Oral            | Creche                  | 18                |
|                        | Recria                  | 18                |
|                        | Engorda                 | 16                |
| Soro                   | Matriz                  | 138               |
|                        | Creche                  | 98                |
|                        | Recria                  | 91                |
|                        | Engorda                 | 88                |
| <b>Total amostras</b>  | -                       | <b>467</b>        |

**Tabela 3:** Relação de quantidade de amostras coletadas em matrizes, de acordo com a ordem de parto.

| <b>Ordem de Parto</b>    | <b>Categoria Animal</b> | <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Quantidade</b> |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| 1-2                      | Matriz                  | Soro                   | 47                |
| 3-4                      | Matriz                  | Soro                   | 45                |
| >5                       | Matriz                  | Soro                   | 46                |
| <b>Total de amostras</b> | -                       | -                      | <b>138</b>        |

Um total de 467 amostras, compostas por 138 amostras de soro de matrizes e 329 amostras de soro e fluido oral de leitões de diversas idades, foram coletadas, processadas e submetidas às técnicas moleculares para o diagnóstico e genotipagem do PCV2 e do PCV3. A detecção de PCV2 foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), enquanto a detecção de PCV3 foi conduzida por nested PCR. Além disso, amostras positivas para PCV2 no teste de qPCR foram submetidas à PCR convencional para genotipagem. As amostras foram divididas por faixa etária, sendo 138 amostras de matrizes, 116 amostras de leitões na fase de creche, 109 leitões na fase de recria e 104 leitões na fase de terminação.

A coleta de fluido oral foi realizada com um N amostral menor devido ao modelo de amostragem envolver o agrupamento de vários suínos, dentro de uma mesma baia, como demonstrado na Figura 9, onde o procedimento de coleta do fluido oral é demonstrado. Cada coleta resultou em aproximadamente 5 a 8ml de fluido oral.



**Figura 9:** Corda posicionada na baia, na altura do dorso dos leitões em fase de creche (A). Parte molhada da corda dentro de saco plástico (B). Fluido oral extraído da corda em saco plástico (C). Fluido oral em tubo Falcon devidamente identificado pronto para o armazenamento e envio ao laboratório (D).

A condução das coletas e organização de materiais necessários foi realizada com o auxílio de um colaborador interno na granja no momento de contenção dos animais, assegurando, simultaneamente, o bem-estar dos suínos durante o procedimento e a segurança de quem realizava as coletas. Essa abordagem garantiu não apenas a precisão e contenção dos animais, mas também uma integração eficaz com as práticas da granja, fortalecendo a validade e confiabilidade dos materiais obtidos.

#### **4.2. Preparo das amostras**

Após as coletas, as amostras foram refrigeradas até o processamento. A retirada da alíquota de soro ocorreu dentro de um intervalo variável de duas horas após a coleta ou no dia subsequente.

Os soros foram separados do coágulo pelo processo de centrifugação. As amostras de fluido oral foram conservadas resfriadas e posteriormente centrifugadas a 3500rpm. As alíquotas de soro foram acondicionadas em microtubos de 2ml e armazenadas em temperatura de -20°C. Da mesma forma, o fluido oral foi mantido a -20°C e submetido à centrifugação imediatamente antes da etapa de extração, evitando assim variações de temperatura.

#### **4.3. Extração**

O DNA total das amostras foi extraído e purificado, utilizando 200mL de soro e 200mL de fluido oral centrifugado. Utilizou-se o kit Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification<sup>®</sup> (Promega, EUA).

Inicialmente, procedeu-se a etapa de lise das células, para exposição do DNA, utilizando a solução de lise com proteinase K, com homogeneização com o auxílio de um vórtex. Posteriormente, para a purificação, essa solução foi transferida para o cartucho Maxwell, e o restante do procedimento ocorreu de forma totalmente automatizada usando a ligação de partículas de sílicas magnetizadas ao ácido nucleico como principal princípio da separação. A eluição foi realizada em água livre de nuclease, conforme orientação do fabricante do kit. A configuração utilizada foi com o hardware de baixo volume de eluição (LEV), e após aproximadamente 45 minutos, a purificação do ácido nucleico estava concluída, pronto para análise. Após a extração e purificação a amostra foi armazenada a -80°C.

Como medida de garantia de qualidade da extração, foram incluídos controles de amostras positivas e negativas durante cada extração, que depois foram submetidas ao teste de qPCR.

#### **4.4. PCR em tempo real para detecção de PCV2**

A detecção e quantificação de cópias genômicas do PCV2 foi realizada nas amostras de soro e fluido oral por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), segundo o protocolo desenvolvido por McIntosh e colaboradores (2009), tendo

como alvo a ORF1 do PCV2.

Para o diagnóstico, foi utilizado o termociclador QuantStudio 1<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em conjunto com um kit de PCR TaqMan<sup>®</sup> da Promega e reagentes específicos para detecção de PCV2, com a seguinte sequência de primers e sonda: P1570 Forward (5'-TGGCCCCGAGTATTCTGATT-3'), P1642 Reverse (5'-CAGCTGGGACAGCAGTTGAG-3') e P1591 Probe (5'-CCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATG-3').

As reações de qPCR foram preparadas em um volume final de 20 mL, contendo 5,1 mL de água nuclease-free, 0,8 mL de Primer P1570 Forward (10mM), 0,8 mL de Primer P1642 Reverse (10mM), 0,8 mL P1591 Probe (5mM), 10 mL de GoTaq<sup>®</sup> Probe qPCR Master Mix 2X, e 2,5 mL de DNA da amostra extraída. Cada amostra foi executada em duplicata.

A amplificação ocorreu com a ativação da DNA polimerase GoTaq<sup>®</sup> a 95°C por 2 minutos. Em seguida, procedeu-se à etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos para separar as fitas de DNA, seguida pela etapa de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Durante essa fase, os primers se ligaram às sequências alvo específicas, permitindo que a Taq polimerase sintetizasse novos filamentos de DNA complementares. Este ciclo de temperatura foi repetido 40 vezes para amplificar o DNA alvo.

Os limiares de ciclo (Ct) foram automaticamente determinados pelo software do termociclador, utilizando a média dos resultados de duplicatas. Em seguida, os valores de Ct foram convertidos em cópias genômicas por mL utilizando uma planilha do Excel validada pelo Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA).

Os resultados obtidos estão representados em log do número de cópias genômicas/mL de soro, apresentados na Tabela 4. Amostras com valores de cópias genômicas inferiores a 1 foram consideradas negativas, sendo este o limite de detecção do teste. Valores entre 2 e 5 cópias genômicas/mL são indicativos de infecção subclínica. Para animais suspeitos de doenças associadas ao PCV2, é considerado um valor de 6 cópias genômicas. Já para classificar animais como positivos, um valor igual ou superior a 7 cópias genômicas/mL é considerado (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

**Tabela 4:** Quantificação da carga viral em cópias genômicas de DNA/mL de soro.

| <b>Resultado em cópias genômicas de DNA/mL de soro – Log</b> | <b>Interpretação</b>                 |
|--|--------------------------------------|
| <1   | Limite de detecção do teste          |
| 2 a 5  | Subclínico                           |
| 6  | Suspeito – Doenças associadas ao PCV |
| ≥7   | Positivo – Doenças associadas ao PCV |

Fonte: Opriessnig *et al.*, 2007.

#### 4.5. Nested PCR para detecção de PCV3

A reação de amplificação do gene do capsídeo (ORF2) na nested PCR foi realizada nas amostras de soro e fluido oral, segundo o protocolo desenvolvido por Chen e colaboradores (2018). Utilizou-se o termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para as reações de PCR.

Foram utilizados dois pares de primers, selecionados a partir de sequências de amostras brasileiras de PCV3, depositadas no GenBank. Na primeira etapa da reação, foram utilizados os primers PCV3 Reverse (5'-AGCACCTCCCCATTATA-3') e PCV3 Forward (5'-AAAGAGGCCAGCGAGTAT'3'), enquanto na segunda etapa, foram utilizados os primers qPCV3 Reverse (5'-CCTGGAGGACCAATAAAA3') e qPCV3 Forward (5'-TGAAGTTGCGGAGAAGAT-3'). Tanto na primeira quanto na segunda reação, o produto do PCR tem tamanho de 131bp. O uso sequencial desses dois conjuntos de primers permite que o produto da primeira reação sirva como molde para a segunda reação, o que resulta em um aumento da especificidade e sensibilidade na detecção da região genômica usada como alvo (SACHSE, 2003).

O preparo das reações de nested PCR foi realizado para um volume final de 22,8mL. Para a primeira reação, foram utilizados 16,95mL de água nuclease-free, 1,00mL de Primer Forward (10mM), 1,00mL de Primer Reverse (10mM), 0,75mL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,3mL de dNTP 10mM, 2,5mL de 10X Tampão de PCR, 0,3mL de Platinum™ Taq DNA Polimerase e 2mL de DNA da amostra extraída. Na segunda reação, apenas os primers foram modificados e, em vez da amostra extraída, 2,0mL do amplicon da primeira reação foi adicionado.

A etapa de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação, a 95°C por 5 minutos, seguida por uma desnaturação a 94°C por 30 segundos para separar as fitas de DNA. Em seguida, ocorreu a etapa de anelamento a 50°C por

45 segundos, durante a qual os primers se ligaram às sequências alvo específicas. A extensão do DNA foi realizada a 72°C por 45 segundos, permitindo que a Taq polimerase sintetizasse novos filamentos de DNA complementares. Após os 40 ciclos de amplificação, uma extensão final foi conduzida a 72°C por 5 minutos para completar a síntese do DNA. Por fim, a amostra foi mantida em espera a 4°C por tempo indeterminado. Na segunda reação de 40 ciclos, apenas a temperatura de anelamento foi ajustada para 45°C, mantendo o tempo de 45 segundos.

Após a amplificação, todos os produtos da reação de nested PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV.

#### **4.6. Eletroforese em gel para detecção da amplificação do gene ORF-2 do PCV3**

A análise dos fragmentos amplificados na nested PCR foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE, corado com 5mL de brometo de etídio. Nove microlitros do produto de PCR amplificado foram aplicados em uma amostra única no gel de eletroforese, juntamente com 5mL de tampão (*Loading Dye Buffer 6x*), para confirmar a amplificação do segmento e visualizar as bandas de DNA por meio de um transiluminador UV.

Como referência para determinar o tamanho das bandas formadas no gel, foi utilizado 7mL de ladder, uma amostra padrão que serve de base para estimar o tamanho aproximado dos fragmentos presentes nas amostras analisadas. Foram consideradas amostras positivas de PCV3 aquelas que apresentaram bandas correspondentes ao tamanho esperado (131 bp)\_da região da ORF-2 de PCV3 amplificada durante a reação de PCR utilizando os primers específicos delineados.

#### **4.7. Metodologia da PCR para genotipagem de PCV2**

A genotipagem para PCV2a, PCV2b e PCV2d, foi realizada em amostras positivas para PCV2 na reação de qPCR. A análise de genotipagem foi conduzida majoritariamente em amostras positivas no qPCR que apresentaram uma concentração de cópias genômicas/mL igual ou superior a 7, devido à maior sensibilidade na detecção dos genótipos quando são utilizadas amostras com maior carga viral.

Para garantir a representatividade das nove granjas analisadas, foram

genotipadas cinco amostras de granjas nas quais não foram detectados valores de cópias genômicas/mL iguais ou superiores a 7. Essas amostras incluíram resultados com 4, 5 e 6 cópias genômicas/mL. Com exceção da granja G9, que não teve nenhuma amostra submetida à genotipagem. Dessa forma, as análises genotípicas englobaram amostras de todas as granjas, com exceção da G9. Essa omissão foi identificada durante a revisão dos dados e cuidadosamente documentada para preservar a precisão e integridade dos resultados.

O método para genotipagem das amostras positivas para PCV2 foi baseado no protocolo proposto por Kwon e colaboradores (2017), utilizando o kit Platinum™Taq Polimerase® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com o termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os primers utilizados para cada genotipagem são descritos a seguir. Para detecção de PCV2a, foram utilizados os primers PCV2a 2NR (5'-GGGGGACCAACAAAATCTC-3') e PCV2ab 2NF (5'-GGTTGGAAGTAATCAATAGTGGA-3'), com o produto esperado de tamanho de 277bp. Para o PCV2b utilizou-se os primers PCV2b 2NR (5'-GGGGCTCAAACCCCGCT-3') e PCV2b 2NF (5'-GGTTGGAAGTAATCAATAGTGGA-3'), também com o produto esperado de tamanho de 277bp. Para o PCV2d, utilizou-se os primers PCV2d 2NR (5'-TCAGAACGCCCTCCTGGA-3'), e PCV2d 2NF (5'-GGTTGGAAGTAATCGATTGTCCT-3'), com o produto esperado de tamanho de 343bp.

O preparo das reações de PCR convencional foi realizado em um volume final de 23mL para cada genótipo. Foram utilizados 17,95mL de água nuclease-free, 0,5mL de Primer Forward (10mM), 0,5mL de Primer Reverse (10mM), 0,75mL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5mL de dNTP 10mM, 2,5mL de 10X Tampão de PCR, 0,3mL de Platinum™ Taq DNA Polimerase e 2mL de DNA da amostra extraída.

A etapa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por uma desnaturação a 94°C por 30 segundos para separar as fitas de DNA. Em seguida, ocorreu a etapa de anelamento a 60°C por 45 segundos, durante a qual os primers se ligaram às sequências alvo específicas. A extensão do DNA foi realizada a 72°C por 45 segundos, permitindo que a Taq polimerase sintetizasse novos filamentos de DNA complementares. Após os 40 ciclos de amplificação, uma extensão final foi conduzida a 72°C por 5 minutos para

completar a síntese do DNA. Por fim, a amostra foi mantida em espera a 4°C por tempo indeterminado.

Todos os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e tampão TAE 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV, como descrito no item 4.7.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Detecção de PCV2 e PCV3 em amostras de soro e fluido oral

O soro é a amostra mais comumente utilizada para a detecção do genoma viral do PCV2, no entanto, coleta de sangue é um método invasivo, que gera estresse nos animais, além de ter que ser feita a coleta de alguns animais na mesma baia para haver representatividade para o diagnóstico da infecção. Já o fluido oral é uma amostra coletada de forma não-invasiva, sendo mais facilmente obtida em uma população de suínos, permitindo um monitoramento de rebanho mais frequente e com uma maior representatividade da circulação de determinados patógenos no rebanho (OLIVER-FERRANDO *et al.*, 2016).

A detecção do PCV3 pode ser realizada utilizando diversas amostras, conforme evidenciado em estudos anteriores. Dentre essas amostras destacam-se o soro e fluido oral (SAPORITI *et al.*, 2021), bem como fetos abortados, leitões mumificados, recém-nascidos e nascidos mortos (Palinski *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2018; Arruda *et al.*, 2019; Dal Santo *et al.*, 2020), além de tecidos como pulmão, linfonodos e baço (SARAIVA *et al.*, 2019) e tonsilas (Wang *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos neste estudo sobre a detecção do genoma viral de PCV2 e PCV3 estão estratificados em tabelas resumidas que diferem de acordo com ordens de parto, fases de produção e tipo de amostra analisada. Eles foram expressos em cópias de DNA/mL de soro ou fluido oral. O monitoramento da carga viral é um indicador tanto de infecção ativa quanto persistente, fornecendo informações importantes para acompanhar o progresso da infecção (MACKAY, 2002).

A Tabela 5 apresenta resultados de quantificação de cópias genômicas para PCV2 e resultados qualitativos de PCV3 nas nove granjas amostradas, de acordo com o tipo de amostra (soro ou fluido oral) e de acordo com a categoria animal.

**Tabela 5:** Resultados segregados por granjas analisadas e tipos de amostra, abrangendo as fases de creche, recria e engorda (CRE), além do soro de matrizes suínas (M).

| Granja    | Tipo de amostra | Cópias genômicas $\geq 7$ - PCV2 | Cópias genômicas 2-5 - PCV2 | Cópias genômicas 6 - PCV2 | Cópias genômicas $< 1$ - PCV2 | PCV3             |
|-----------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| <b>G1</b> | Soro M          | 0%                               | 13,33%<br>(2/15)            | 0%                        | 86,67%<br>(13/15)             | 40%<br>(6/15)    |
|           | Soro CRE        | 0%                               | 24,14%<br>(7/29)            | 0%                        | 75,86%<br>(22/29)             | 3,45%<br>(1/29)  |
|           | Fluido Oral     | 16,67% (1/6)                     | 83,33%<br>(5/6)             | 0%                        | 0%                            | 0%               |
| <b>G2</b> | Soro M          | 0%                               | 100%<br>(15/15)             | 0%                        | 0%                            | 6,67%<br>(1/15)  |
|           | Soro            | 19,35% (6/31)                    | 48,39%<br>(15/31)           | 19,35%<br>(6/31)          | 12,90%<br>(4/31)              | 3,23%<br>(1/31)  |
|           | Fluido Oral     | 66,67% (4/6)                     | 0%                          | 33,33%<br>(2/6)           | 0%                            | 16,67%<br>(1/6)  |
| <b>G3</b> | Soro M          | 0%                               | 80% (12/15)                 | 0%                        | 20% (3/15)                    | 0%               |
|           | Soro CRE        | 19,35% (6/31)                    | 41,94%<br>(13/31)           | 16,13%<br>(5/31)          | 22,58%<br>(7/31)              | 9,68%<br>(3/31)  |
|           | Fluido Oral     | 16,67% (1/6)                     | 66,67%<br>(4/6)             | 16,67%<br>(1/6)           | 0%                            | 0%               |
| <b>G4</b> | Soro M          | 0%                               | 6,67%<br>(1/15)             | 0%                        | 93,33%<br>(14/15)             | 0%               |
|           | Soro CRE        | 13,33% (4/30)                    | 46,67%<br>(14/30)           | 3,33%<br>(1/30)           | 36,67%<br>(11/30)             | 3,33%<br>(1/30)  |
|           | Fluido Oral     | 50%<br>(3/6)                     | 0%                          | 50%<br>(3/6)              | 0%                            | 0%               |
| <b>G5</b> | Soro M          | 0%                               | 60%<br>(9/15)               | 0%                        | 40% (6/15)                    | 0%               |
|           | Soro CRE        | 0%                               | 46,88%<br>(15/32)           | 3,13%<br>(1/32)           | 50% (16/32)                   | 21,88%<br>(7/32) |
|           | Fluido Oral     | 0%                               | 0%                          | 0%                        | 100% (6/6)                    | 16,67%<br>(1/6)  |
| <b>G6</b> | Soro M          | 0%                               | 33,33%<br>(5/15)            | 0%                        | 66,67%<br>(10/15)             | 0%               |
|           | Soro CRE        | 0%                               | 39,39%<br>(13/33)           | 0%                        | 60,61%<br>(20/33)             | 0%               |

|              |             |                                 |                                   |                                 |                                   |                                  |
|--------------|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|              | Fluido Oral | 0%                              | 0%                                | 0%                              | 100% (6/6)                        | 0%                               |
| <b>G7</b>    | Soro M      | 0%                              | 5,88%<br>(1/17)                   | 0%                              | 94,12%<br>(16/17)                 | 0%                               |
|              | Soro CRE    | 0%                              | 76,67%<br>(23/30)                 | 0%                              | 23,33%<br>(7/30)                  | 20%<br>(6/30)                    |
|              | Fluido Oral | 0%                              | 83,33%<br>(5/6)                   | 0%                              | 16,67%<br>(1/6)                   | 0%                               |
| <b>G8</b>    | Soro M      | 0%                              | 6,25%<br>(1/16)                   | 0%                              | 93,75%<br>(15/16)                 | 37,5%<br>(6/16)                  |
|              | Soro CRE    | 0%                              | 0%                                | 0%                              | 100%<br>(30/30)                   | 10%<br>(3/30)                    |
|              | Fluido Oral | 0%                              | 83,33%<br>(5/6)                   | 16,67%<br>(1/6)                 | 0%                                | 50%<br>(3/6)                     |
| <b>G9</b>    | Soro M      | 0%                              | 40%<br>(6/15)                     | 0%                              | 60% (9/15)                        | 40%<br>(6/15)                    |
|              | Soro CRE    | 0%                              | 87,10%<br>(27/31)                 | 0%                              | 12,90%<br>(4/31)                  | 12,90%<br>(4/31)                 |
|              | Fluido Oral | 0%                              | 0%                                | 0%                              | 100% (4/4)                        | 0%                               |
| <b>Total</b> | -           | <b>5,35%</b><br><b>(25/467)</b> | <b>42,40%</b><br><b>(198/467)</b> | <b>4,28%</b><br><b>(20/467)</b> | <b>47,97%</b><br><b>(224/467)</b> | <b>10,71%</b><br><b>(50/467)</b> |

Soro M: Soro de matrizes

Soro CRE: Soro das categorias creche, recria e engorda/terminação

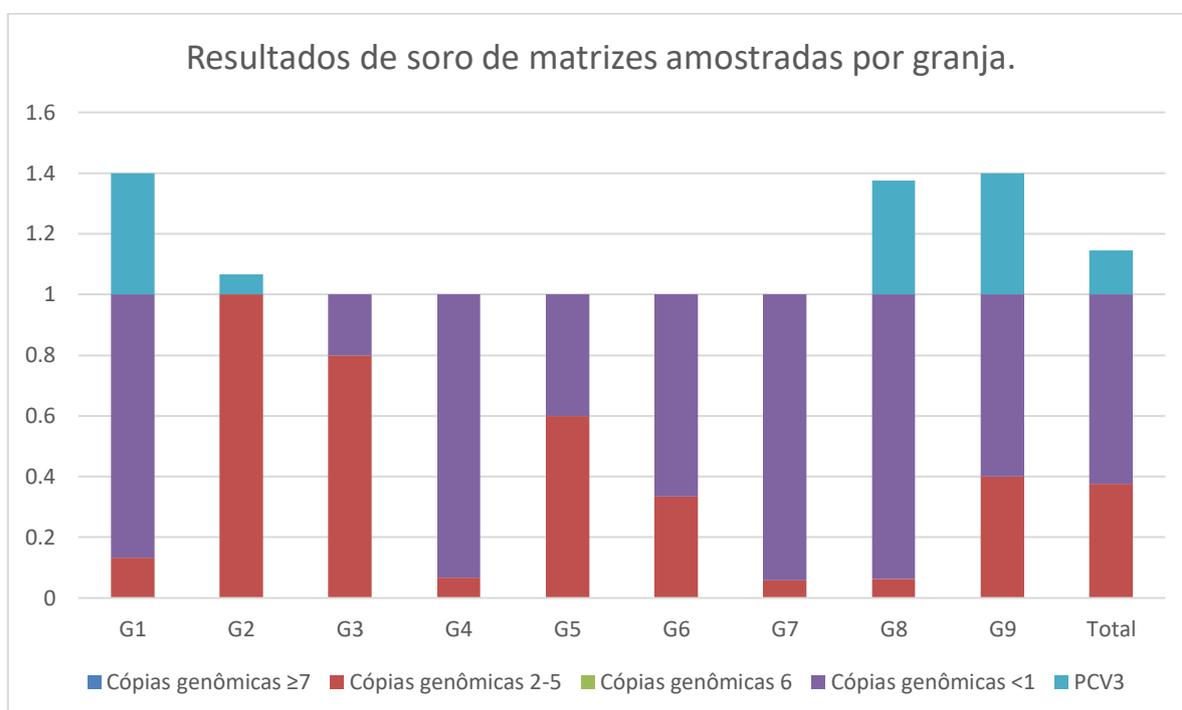
A tabela 5 apresenta resultados de positividade para PCV2 com cópias genômicas  $\geq 7$  e PCV3 nas nove granjas amostradas, de acordo com o tipo de amostra (soro ou fluido oral) e de acordo com a categoria animal, observamos que a granja G2 teve maior proporção de amostras consideradas positivas para PCV2 em amostras de soro (19,35%) e fluido oral (66,67%) seguida por G4 e G3, indicando uma maior probabilidade de apresentação de sinais clínicos associados à infecção por PCV2 nestas granjas, além de alterações nos índices produtivos dos animais, como GPD e taxa de conversão alimentar. As granjas G5, G6, G7, G8 e G9 não apresentaram cópias genômicas  $\geq 7$  para PCV2 e tiveram uma proporção máxima de animais com número de cópias genômicas 6 de 16,67% detectada apenas em amostras de fluido oral. Por outro lado, G7, G8 e G9 tiveram uma maior proporção de animais considerados subclínicos, sendo de 2 a 5 o

número de cópias genômicas.

Quanto ao PCV3, a granja G8 apresentou uma proporção significativamente maior de amostras positivas em fluido oral (50%) do que em soro (10%). Curiosamente, as amostras de fluido oral mostraram uma menor positividade para PCV3 em comparação com PCV2, como observado nas granjas G1, G2, G4, G7 e G9, onde não houve detecção de positividade para PCV3, a granja G6 não apresentou positividade para o PCV3 em nenhum tipo de amostra analisado, sendo considerada negativa para este vírus. A prevalência de animais positivos variou entre as granjas, com algumas mostrando taxas mais altas de amostras positivas. Observamos a presença do PCV3 na região da Zona da Mata Mineira, exceto na granja G9, onde não foram detectadas amostras positivas para o vírus.

Os resultados quantitativos das porcas classificadas por granja são apresentados no Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Resultados das amostras consideradas positivas por PCR de soro de matrizes para PCV2 e PCV3, classificados por granja.

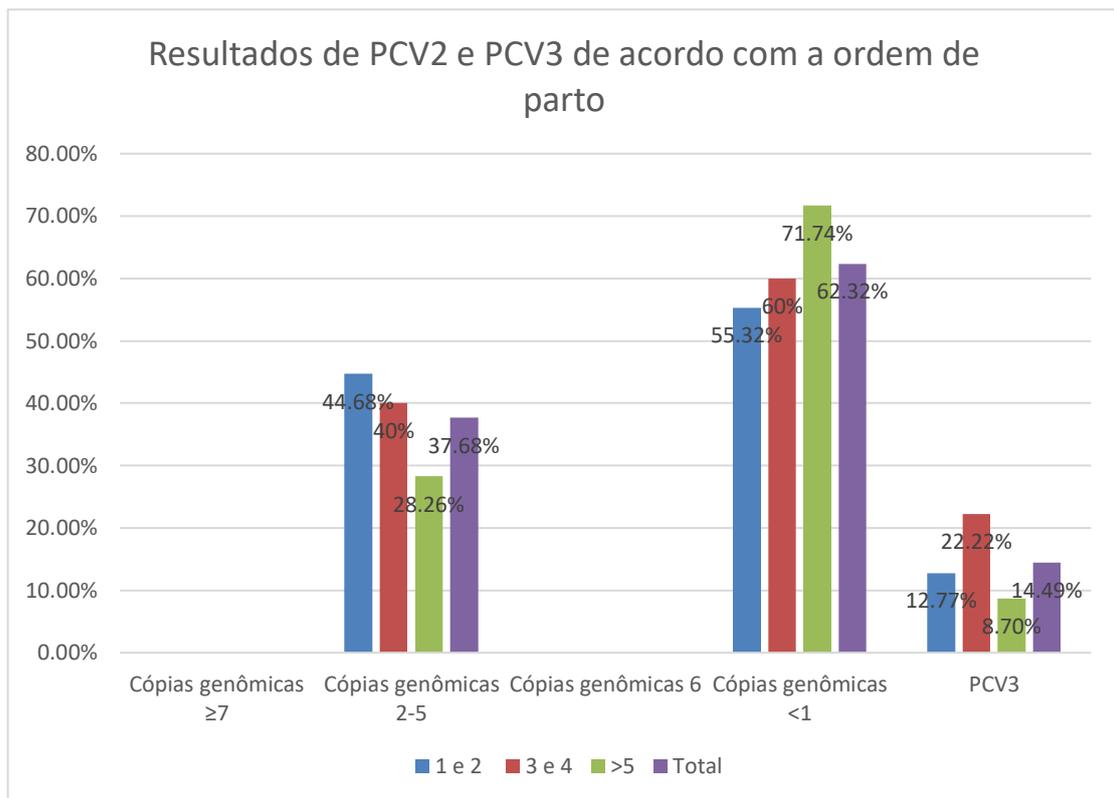


A presença de infecção considerada subclínica por PCV2 em matrizes é relevante em cinco das nove granjas, ou seja, matrizes com número de cópias genômicas entre 2 e 5, embora as taxas variem consideravelmente entre elas. A

maioria dos casos de infecção subclínica por PCV2 é observada em granjas específicas, como G2 (100%), G3 (80%) e G5 (60%). Esses resultados sugerem que diferentes fatores como práticas de manejo, protocolos de vacinação e medidas de biossegurança, podem influenciar na disseminação e no controle do vírus em diferentes ambientes de produção (Madec *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2012; Patterson *et al.*, 2015). No entanto, granjas como G1 (86,67%), G4 (93,33%), G7 (94,12%) e G8 (93,75%) demonstraram alta negatividade, com o número de cópias genômicas <1.

Apesar de menos prevalente em comparação ao PCV2, o PCV3 demonstra uma presença mais notável nas granjas G1 (40%), G8 (37,5%) e G9 (40%), sendo que quatro das nove granjas amostradas, foram positivas para este vírus. Essa variação pode refletir diferentes níveis de exposição e susceptibilidade ao vírus.

**Gráfico 2:** Resultados de amostras de soro consideradas positivas para PCV2 e PCV3 nas porcas amostradas, agrupadas pela ordem de parto.



OP: Ordem de parto

Matrizes com ordens de parto mais altas (>5) apresentaram uma proporção maior de resultados considerados negativos para o PCV2 (71,74%) em

comparação com as matrizes com ordens de parto mais baixas (1-2 e 3-4) com 55,32% e 60% respectivamente, como detalhado no Gráfico 2.

Provavelmente, isso se deve à exposição prévia ao antígeno, seja por meio de imunização e/ou pela produção de anticorpos resultantes de infecções ao longo da vida da matriz. No entanto, não foi realizada sorologia para identificar o status sorológico das matrizes, para determinar as subpopulações sorologicamente diversas de marrãs/porcas de cada rebanho. Essa observação sugere que matrizes mais velhas provavelmente possuem uma resposta imune humoral e celular mais robusta, resultante da exposição a uma maior variedade de patógenos ao longo de suas vidas, o que contribui para uma resposta imune potencialmente mais eficaz. Além disso, a presença dessas matrizes no rebanho pode atuar como um tampão imunológico, reduzindo a disseminação de infecções e protegendo animais mais jovens. O equilíbrio entre o descarte de matrizes mais velhas e a introdução de leitoas é crucial para manter a estabilidade enzoótica, pois descartes excessivos podem comprometer o status sanitário sanidade do rebanho.

No entanto, matrizes com ordens de parto mais baixas apresentaram uma proporção maior de resultados com número de cópias genômicas mais baixos, sugerindo infecções subclínicas. A ocorrência de infecções subclínicas só podem ser detectada por meio de diagnóstico laboratorial, que deve ser feito com relativa frequência nos rebanhos, para propiciar um melhor manejo sanitário, com impacto positivo na prevenção e no controle de doenças no rebanho. Não foram identificadas neste estudo matrizes com carga viral sugestivas de doença clínica ou de suspeitas de doença clínica causada por PCV2 em nenhuma das ordens de parto analisadas.

É importante notar que a positividade para o PCV3 não segue necessariamente a mesma tendência relatada para o PCV2, observando-se algumas variações entre as diferentes ordens de parto, com maior proporção de positividade em matrizes com ordens de parto mais baixas (1-2 e 3-4), e com prevalência maior em matrizes de 3 e 4 partos (22,22%) (Gráfico 2). O manejo sanitário e a saúde geral das matrizes variam conforme a idade e o número de partos, assim como o status sanitário do rebanho e os patógenos presentes na granja. Outro fator que poderia explicar essa diferença entre a frequência de infecções por PC2 e PCV3 em matrizes de diferentes ordens de parto seria ligado

a aspectos epidemiológicos da infecção do PCV3, que ainda são desconhecidos, em grande parte, por se tratar de um patógeno emergente.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados das análises de PCR para detecção de PCV2 e PCV3, tanto em amostras de soro, quanto em amostras de fluido oral, nas três fases de crescimento amostradas (creche, recria e terminação).

**Tabela 6:** Resultados das análises de PCR para detecção de PCV2 e PCV3, por tipo de amostra analisada, em cada categoria animal.

| Categoria Animal | Tipo de amostra | Cópias genômicas $\geq 7$       | Cópias genômicas 2-5              | Cópias genômicas 6              | Cópias genômicas $< 1$            | PCV3                            |
|------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
|                  |                 | - PCV2                          | - PCV2                            | - PCV2                          | - PCV2                            |                                 |
| Creche           | Soro            | 1,02%<br>(1/98)                 | 54,08%<br>(53/98)                 | 1,02%<br>(1/98)                 | 43,88%<br>(43/98)                 | 11,22%<br>(11/98)               |
| Creche           | Fluido Oral     | 0%                              | 38,89%<br>(7/18)                  | 22,22%<br>(4/18)                | 38,89%<br>(7/18)                  | 0%                              |
| Recria           | Soro            | 5,49%<br>(5/91)                 | 38,46%<br>(35/91)                 | 6,59%<br>(6/91)                 | 49,45%<br>(45/91)                 | 2,20%<br>(2/91)                 |
| Recria           | Fluido Oral     | 22,22%<br>(4/18)                | 44,44%<br>(8/18)                  | 0%                              | 33,33%<br>(6/18)                  | 11,11%<br>(2/18)                |
| Engorda          | Soro            | 11,36%<br>(10/88)               | 44,32%<br>(39/88)                 | 6,82%<br>(6/88)                 | 37,5%<br>(33/88)                  | 14,77%<br>(13/88)               |
| Engorda          | Fluido Oral     | 31,25%<br>(5/16)                | 25%<br>(4/16)                     | 18,75%<br>(3/16)                | 25%<br>(4/16)                     | 11,54%<br>(3/16)                |
| <b>Total</b>     | -               | <b>7,60%</b><br><b>(25/329)</b> | <b>44,38%</b><br><b>(146/329)</b> | <b>6,08%</b><br><b>(20/329)</b> | <b>41,95%</b><br><b>(138/329)</b> | <b>9,42%</b><br><b>(31/329)</b> |

Na fase de creche, foi observada uma menor proporção de animais com cópias genômicas  $\geq 7$ , considerados positivos para PCV2, em comparação com a fase de recria e engorda. No entanto, a taxa de animais com o número de cópias genômicas 6, sendo suspeitos para a doença, foi alta em amostras de fluido oral, sugerindo uma possível exposição ao vírus nessa fase. Já nas fases de recria e engorda, as taxas consideradas positivas para PCV2 foram mais elevadas, quando detectadas através das amostras agrupadas, indicando uma maior prevalência do vírus nesses estágios de desenvolvimento.

A análise dos dados destaca uma menor positividade (cópias genômicas  $\geq 7$ ) de PCV2 na fase de creche que pode ser atribuída à imunidade pós-vacinal

conferida pela vacinação rotineira contra o PCV2. No entanto, a alta taxa de animais suspeitos, com número de cópias genômicas 6 nesta fase sugere uma possível exposição ao vírus, ressaltando a importância da vigilância contínua e do monitoramento precoce para detectar sinais de reemergência ou falhas na eficácia da vacinação.

Uma parcela significativa das amostras em todas as fases de produção e tipos de amostras são classificadas como subclínica para PCV2, com cópias genômicas entre 2 e 5. Isso sugere que os animais estão infectados, porém assintomáticos, o que indica uma resposta do sistema imunológico destes animais, estimulado pela vacinação e/ou de forma ativa, após contato com vírus circulante nas granjas, reduzindo a possibilidade de ocorrência de doença clínica, diminuindo o surgimento de sinais clínicos evidentes (SAPORITI *et al.*, 2021).

Os dados da literatura sugerem que as vacinas contra PCV2 diminuem a incidência de doença clínica, mas não impedem a infecção pelo vírus nos animais vacinados (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SAPORITI *et al.*, 2021). Animais com baixa viremia apresentam menor soroconversão e conseguem diminuir o impacto da infecção viral, sem apresentar doenças associadas, constituindo a forma clínica (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

Na fase de engorda/terminação observou-se uma taxa de resultados positivos com o número de cópias genômicas  $\geq 7$  de PCV2, de 11,36% das amostras de soro e de 31,25% das amostras de fluido oral. Essa carga viral corresponde à maior probabilidade dos animais dessa faixa etária apresentarem doença clínica em relação às demais fases de crescimento. É importante lembrar que as amostras de fluido oral são amostras agrupadas, representando diferentes animais na mesma amostra, o que pode explicar a maior taxa de positividade.

Os dados levantados a respeito da vacinação contra PCV2 nas diferentes granjas amostradas são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Detalhes da vacinação contra PCV2 nas diferentes granjas amostradas.

| Granja    | Vacina | Esquema de vacinação – Leitões (média) | Esquema de vacinação – Leitoas (média)                                      | Esquema de vacinação – Porcas (média)    | Atualização de Boas Práticas de Vacinação |
|-----------|--------|--|---|--|---|
| <b>G1</b> | A      | 21 dias (1ml)                          | NA  | NA                                       | <1 ano                                    |
| <b>G2</b> | B      | 21 dias (0,5ml)                        | NA  | NA                                       | <1ano                                     |
| <b>G3</b> | A      | 21 dias (1ml)                          | 150 dias ou 160 dias (1ml)  | 10 dias pós-parto (1ml)                  | >5anos                                    |
| <b>G4</b> | C      | 21 dias (2ml) e 42 dias (2ml)          | 150 dias (2ml) e 190 dias (2ml)   | 7 dias pós-parto (2ml) - até sexto parto | >1 ano                                    |
| <b>G5</b> | D      | 21 dias (2ml) e 42 dias (2ml)          | Recebe leitoa já vacinada   | 80 e 100 dias de gestação (2ml)          | >5 anos                                   |
| <b>G6</b> | A e C  | 40 dias A (1ml) e 60 dias C (0,5ml)    | 26 dias após a chegada na granja aplica a vacina A (1ml) e 160 dias C (2ml) | 90 dias de gestação (1ml)                | 1,5 ano                                   |
| <b>G7</b> | D      | 20 dias (2ml)                          | 150 dias (2ml)  | 5-7 dias pós-parto (2ml)                 | >2 anos                                   |
| <b>G8</b> | A      | 26 dias (1ml)                          | 180 dias (1ml)  | não vacina                               | não teve                                  |
| <b>G9</b> | E      | 21 dias (1ml) e 47 dias (1ml)          | 190 dias (1ml)  | 7 dias pós-parto - só leitoa             | não teve                                  |

IM: Intramuscular

NA: Dado não disponível

Dentre as nove granjas participantes deste estudo, quatro delas adotam essa prática (G4, G5, G6 e G9), administrando uma dose de vacina no dia do desmame, em média aos 21 dias de idade, e uma segunda dose entre 42 e 47 dias de idade, como demonstrado na Tabela 7. A exceção é a granja G6, que adota o esquema de vacinação aos 40 e 60 dias de idade. De acordo com estudos anteriores, uma possível explicação para a adoção de protocolos de vacinação em idades diferentes pode ser devido à dinâmica da circulação viral que ocorre nesta granja (OLIVER-FERRANDO *et al.*, 2016).

Embora todos os animais amostrados tenham sido vacinados contra o PCV2, com diferentes vacinas comerciais ou protocolos distintos, observou-se que em sete das nove granjas amostradas não houve atualização em boas práticas de vacinação por um período superior a 1,5 ano, enquanto em duas delas houve o relato de nunca terem recebido treinamento específico para vacinação.

Esta constatação levanta questionamentos sobre a eficácia da vacinação e sugere a importância de reavaliar a qualidade dos procedimentos de vacinação, bem como revisar os protocolos de armazenamento e aplicação das vacinas.

A presença de animais considerados subclínicos em uma população de suínos vacinados pode indicar uma aparente eficácia da vacinação na prevenção da doença clínica, no entanto, a avaliação cuidadosa da efetividade dessa proteção é essencial para garantir a saúde e o bem-estar dos animais (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

A frequência de PCV3 foi de 14,49% no total das amostras analisadas no soro de matrizes, enquanto em amostras de soro e fluido oral de animais nas fases de crescimento (creche, recria e engorda), registrou-se a frequência de 9,39% em soro, e de 9,63% em fluido oral. Estes resultados estão de acordo com estudos recentes onde o PCV3-SD tem sido pouco diagnosticado em suínos de crescimento até o momento (Arruda *et al.*, 2019; Williamson *et al.*, 2021). Já o PCV3-RD parece ocorrer com maior frequência (Arruda *et al.*, 2019; Saporiti *et al.*, 2021; Williamson *et al.*, 2021).

Resultados qualitativos oferecem dados importantes sobre a presença e distribuição deste vírus nas diferentes fases de produção, o que destaca a necessidade de considerar o PCV3 como parte da vigilância e do controle de doenças juntamente com análises de dados zootécnicos específicos da granja.

Como mostrado na tabela 5, a granja G9 foi a única em que não foram detectadas amostras positivas para PCV3. Esta granja se destacou por apresentar um maior número de medidas para melhorar sua biossegurança, conforme indicado pelos principais pontos analisados neste estudo, apresentados na Tabela 8. Esta maior preocupação e cuidado com a biossegurança pode ser o motivo pelo qual o PCV3 não foi detectado na granja, além de ser uma granja livre de *Mycoplasma spp.*

**Tabela 8:** Informações sobre biosseguridade das granjas amostradas no estudo, com foco na entrada de pessoas e animais.

| Granja | Número de granjas em um raio de 6km | Estacionam perto das baías | Embarcadouro perto das baías | Vazio Sanitário (visitantes) | Troca de roupa na entrada | Banho na entrada | Aquisição de animais para reposição |
|--------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------------------|
| G1     | 2                                   | não                        | sim                          | não                          | sim                       | não              | bisavó                              |
| G2     | 5                                   | não                        | não                          | não                          | não                       | não              | marrã                               |
| G3     | 5                                   | sim                        | sim                          | não                          | sim                       | não              | bisavó                              |
| G4     | 2                                   | sim                        | sim                          | não                          | sim                       | não              | NA                                  |
| G5     | 1                                   | sim                        | sim                          | não                          | sim                       | não              | marrã                               |
| G6     | 3                                   | não                        | não                          | sim                          | sim                       | sim              | avó                                 |
| G7     | 2                                   | sim                        | não                          | não                          | sim                       | não              | avó                                 |
| G8     | 3                                   | não                        | sim                          | não                          | não                       | não              | avó                                 |
| G9     | 2                                   | sim                        | sim                          | não                          | sim                       | não              | marrã                               |

NA: Dado não disponível

Obs: Todas as granjas são de ciclo completo em sítio único.

## 5.2. Genotipagem das amostras positivas para PCV2

No estudo, entre as 467 amostras coletadas e analisadas por qPCR para PCV2, foram selecionadas 29 amostras com cópias genômicas  $\geq 7$  para PCV2 no qPCR, para genotipagem de PCV2, representando 6,2% do total. Estas amostras, abrangendo tanto amostras de soro quanto de fluido oral, foram submetidas à genotipagem para os três principais genótipos de PCV2 circulantes em granjas comerciais no Brasil e no mundo, sendo PCV2a, PCV2b e PCV2d.

A seleção das amostras para genotipagem foi realizada com base em dois critérios distintos. Foram escolhidas todas as amostras identificadas como positivas para PCV2, com uma concentração de cópias genômicas/mL igual ou superior a 7. Além disso, as amostras com carga viral compatíveis com suspeita de doença clínica ou como infecções subclínicas foram genotipadas quando nenhum animal positivo foi identificado em uma determinada granja, garantindo a inclusão de pelo menos uma amostra de cada granja na genotipagem, com exceção da Granja 9, que não foi amostrada. Os resultados qualitativos obtidos estão demonstrados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Distribuição de amostras genotipadas e resultados para PCV2a, PCV2b, PCV2d e coinfeção entre PCV2d e PCV3.

| <b>Categoria Animal</b> | <b>Tipo de Amostra</b> | <b>Quantidade de Amostras Genotipadas</b> | <b>PCV2a</b> | <b>PCV2b</b> | <b>PCV2d</b>         | <b>PCV2d + PCV3</b> |
|-------------------------|------------------------|---|--------------|--------------|----------------------|---------------------|
| Matriz                  | Soro                   | 6,90% (2/29)                              | 0%           | 0%           | 0%                   | 0%                  |
| Creche                  | Soro                   | 6,90% (2/29)                              | 0%           | 0%           | 0%                   | 0%                  |
|                         | Fluido oral            | 0%  | 0%           | 0%           | 0%                   | 0%                  |
| Recria                  | Soro                   | 13,79% (4/29)                             | 0%           | 0%           | 50% (2/4)            | 0%                  |
|                         | Fluido oral            | 17,24% (5/29)                             | 0%           | 0%           | 40% (2/5)            | 0%                  |
| Engorda                 | Soro                   | 34,48% (10/29)                            | 0%           | 0%           | 20% (2/10)           | 0%                  |
|                         | Fluido oral            | 20,69% (6/29)                             | 0%           | 0%           | 16,67% (1/6)         | 3,45% (1/29)        |
| <b>Total</b>            |                        | <b>100% (29/29)</b>                       | 0%           | 0%           | <b>24,14% (7/29)</b> | <b>3,45% (1/29)</b> |

Dentre as 29 amostras analisadas, sete foram identificadas como positivas para o genótipo PCV2d, representando uma positividade de 24,1%. Dessas amostras, três foram coletadas do fluido oral durante as fases de recria e engorda, enquanto as outras quatro eram de soro, também nas fases de recria e engorda. As demais amostras apresentaram resultados negativos para os genótipos PCV2a e PCV2b.

Cinco das 29 amostras apresentaram baixa viremia, com cópias genômicas/mL abaixo de 6. A negatividade na análise de genótipos era esperada, uma vez que a carga viral era muito baixa para ser detectada. Além dessas cinco amostras, outras 17, com cópias genômicas acima de 7, não foram positivas para nenhum dos genótipos analisados. Isso representa 70,83% destas amostras, indicando uma possibilidade significativa de outros genótipos ou possíveis variantes do PCV2, sendo que até o momento foram descritos nove genótipos do PCV2, PCV2a-PCV2i (Wang *et al.*, 2020). No Brasil, o genótipo PCV2c já foi detectado em amostras de suínos selvagens no Pantanal (FRANZO *et al.*, 2015), assim como na Dinamarca (DUPONT *et al.*, 2008) e na China (Liu *et al.*, 2016), mas ainda não há relatos de sua ocorrência em rebanhos comerciais no Brasil. Outros genótipos foram detectados na China, como PCV2e (FRANZO; SEGALÉS, 2018; XU *et al.*, 2022) e nos EUA, como o PCV2i (Wang *et al.*, 2020). Os demais genótipos, PCV2f, PCV2g e PCV2h, compreendem clados menores, presentes em áreas pontuais e presumivelmente de menor importância (Xiao *et al.* 2012; Sibila *et al.*, 2021). Os genótipos PCV2a, PCV2b e PCV2d estão distribuídos mundialmente e são associados a impactos econômicos negativos nas propriedades onde são identificados, com o PCV2d atualmente sendo o mais

prevalente (Franzo & Segalés, 2020).

A ausência de detecção de PCV2a e PCV2b nas amostras genotipadas era de certa forma esperada, pois o PCV2a e PCV2b estão circulando com uma prevalência reduzida em diversos países (Wang *et al.*, 2020). Essa menor prevalência de circulação de alguns genótipos tem sido descrita, principalmente para o PCV2a, conforme evidenciado por estudos anteriores que relataram mudanças na frequência de genótipos circulantes (Karuppanan & Opriessnig, 2017; Opriessnig *et al.*, 2020). O PCV2a era o genótipo mais prevalente até meados de 2003, até que houve uma substituição gradual para o genótipo PCV2b (Dupont *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2013). Por outro lado, a detecção de PCV2d nas amostras positivas era esperada, considerando pesquisas recentes que apontam o PCV2d como o genótipo mais prevalente em importantes regiões produtoras de suínos, incluindo o Brasil (Xiao *et al.*, 2015; Franzo *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2017).

Em um estudo desenvolvido no Brasil, não foi possível detectar os genótipos PCV2a, PCV2b e PCV2d em 20,12% (67/333) das amostras. Neste mesmo estudo, o maior número de amostras genotipadas foram oriundas de animais das fases de recria e terminação (MIOTTO *et al.*, 2023), assim como no presente estudo, que contou com o maior número de amostras genotipadas nas fases de recria e engorda.

Estes achados ressaltam a importância da vigilância contínua e da caracterização genotípica abrangente do PCV2 em populações suínas, visando uma compreensão mais completa da epidemiologia e da evolução viral. Como perspectiva futura, o sequenciamento pode ser uma opção devido à grande variabilidade genética do vírus, proporcionando uma visão mais abrangente da diversidade genética do PCV2 na população estudada, além de detecção precoce de possíveis novas variantes, o que é fundamental para controle e prevenção eficazes da doença.

### **5.3. Coinfecção entre PCV3 e os diferentes genótipos de PCV2**

Conforme evidenciado na Tabela 9, entre todas as amostras com os genótipos analisados, apenas 3,45% (1/29) (4,17% quando considerado somente as 24 amostras em que foi possível determinar o genótipo de PCV2) apresentaram uma coinfecção entre PCV2d e PCV3. É importante considerar que 70,83% das

amostras genotipadas não demonstraram positividade para nenhum dos genótipos ou variantes potenciais do PCV2. Deve ser levada em consideração a possibilidade de que fazendas vacinadas com PCV2 podem ter uma menor porcentagem de animais coinfectedos (SAPORITI *et al.*, 2020).

Este resultado alinha-se com a baixa frequência de coinfeções observada na Europa entre PCV2 e PCV3, onde apenas 3% (16/624) dos soros testados por PCR foram positivos para ambos os vírus (SAPORITI *et al.*, 2020). Nos EUA, um estudo revelou uma taxa de coinfeção de 8,4% (76/910), principalmente em amostras de soro e fluido oral (Wang *et al.*, 2020). Na China, um trabalho realizado em 2018 demonstrou uma coinfeção de 22,3% (17/76) entre o PCV2 e PCV3 (FU *et al.*, 2018). A frequência de coinfeção entre o PCV2 e o PCV3 está de acordo com outros estudos publicados anteriormente, indicando padrões de circulação independentes (Saporiti *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

#### **5.4. Avaliação do fluido oral como amostra biológica para diagnóstico da infecção por PCV2 e PCV3**

Amostras de fluido oral apresentaram uma menor positividade para o PCV3 em comparação com as amostras de soro. Embora o PCV3 tenha sido detectado em fluido oral em apenas 3 das 8 granjas (uma granja foi considerada negativa para este vírus), a positividade geral no soro também foi baixa. Considerando que as amostras de fluido oral são agrupadas, representando diferentes animais na mesma baía, a carga viral pode ter sido menor, resultando em não positividade no teste.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram proporções significativas de amostras consideradas positivas, subclínicas e suspeitas na quantificação de cópias genômicas de PCV2 e na positividade em amostras de PCV3 em de fluidos orais em algumas categorias animais. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que sugeriram que as taxas positivas de PCV2 e PCV3 foram mais altas em fluidos orais em comparação com soros, indicando a exposição oral como a possível via ativa de transmissão (OLIVER-FERRANDO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). Portanto, os dados apresentados estão de acordo com dados da literatura, que mostram que a utilização de amostras de fluido oral é uma alternativa viável e adequada para a monitorar a circulação de PCV2 e PCV3 nas granjas, especialmente onde a

coleta de sangue pode ser desafiadora ou estressante para os animais (Prickett *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2018; Y. Wang *et al.*, 2020).

## **6. CONCLUSÕES**

Este estudo forneceu uma visão abrangente da prevalência de PCV2 e coinfeção entre PCV2 e PCV3 em suínos de granjas amostradas na Zona da Mata Mineira, destacando a importância da vigilância contínua desses vírus para a saúde suína. Os resultados revelaram uma alta incidência de infecções subclínicas por PCV2, a predominância do genótipo PCV2d, e uma baixa frequência de coinfeção com PCV3. Além disso, a utilização de fluido oral como uma alternativa eficaz para o diagnóstico foi confirmada, sugerindo uma abordagem menos invasiva e estressante para os animais. Essas descobertas oferecem informações para o desenvolvimento de estratégias de controle e monitoramento dessas doenças em regiões geográficas de relevância na produção suína, como a Zona da Mata Mineira.

## 7. REFERENCIAS

ALLAN, G. M. *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 49–64, abr. 1995.

ALLAN, G. M. *et al.* Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe **J Vet Diagn Invest**. [s.l: s.n.].

ARRUDA, B. *et al.* PCV3-associated disease in the United States swine herd. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 684–698, 16 jan. 2019.

ASSAO, V. S. *et al.* Genetic diversity of porcine circovirus 3 strains and the first detection of two different PCV3 strains coinfecting the same host in Minas Gerais, Brazil. **Archives of Virology**, v. 166, n. 5, p. 1463–1468, 15 maio 2021.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CAPRIOLI, A. *et al.* PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 287–292, out. 2006.

CHEN, G. *et al.* Development of a SYBR green-based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs. **Journal of Virological Methods**, v. 251, p. 129–132, jan. 2018.

CHEN, G. H. *et al.* Detection and genome sequencing of porcine circovirus 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 1650–1654, dez. 2017.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 522–527, out. 2003.

DAL SANTO, A. C. *et al.* Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 104027, abr. 2020.

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

DVORAK, C. M. T. *et al.* Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 365–374, out. 2013.

ELLIS, J. *et al.* **Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome**J. [s.l: s.n.].

### **Epitools - Epidemiological Calculators.**

FRAILE, L. *et al.* Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 1–2, p. 229–234, dez. 2012.

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

FRANZO, G.; SEGALÉS, J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208585, 6 dez. 2018.

FRANZO, G.; SEGALÉS, J. Porcine Circovirus 2 Genotypes, Immunity and Vaccines: Multiple Genotypes but One Single Serotype. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1049, 14 dez. 2020.

FRANZO, G.; SEGALÉS, J. Porcine circovirus 3 (PCV-3) variability: Is it in the virus or in the classification criteria? **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 26, 9 fev. 2023.

FU, X. *et al.* 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. e296–e303, abr. 2018.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 2, p. pdb.prot095182, 1 fev. 2019.

HA, Y.; JUNG, K.; CHAE, C. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. **Veterinary Record**, v. 156, n. 12, p. 383–384, 19 mar. 2005.

HARDING, J. C. S. *et al.* **Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation***Swine Health and Production*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.aasp.org/shap.html>>.

HOLGADO-MARTÍN, R. *et al.* First detection of porcine circovirus 4 (PCV-4) in Europe. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 230, 10 out. 2023.

JEONG, J. *et al.* Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 1–2, p. 43–52, maio 2015.

KENNEDY, S. *et al.* **Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors** *J Vet Diagn Invest.* [s.l: s.n.].

KLAUMANN, F. *et al.* Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. **Veterinary Record**, v. 184, n. 20, p. 619, 18 maio 2019.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 15 mar. 2002.

MADEC, F. *et al.* Post-weaning 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, maio 2000.

MAITY, H. *et al.* Revisiting Porcine Circovirus Infection: Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector. **Vaccines**, v. 11, n. 8, p. 1308, 31 jul. 2023.

MCINTOSH, K. A. *et al.* Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 23–33, jan. 2009.

MEEHAN, B. M. *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 1, p. 221–227, 1 jan. 1997.

MEEHAN, B. M. *et al.* **Printed in Great Britain Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs** *Journal of General Virology.* [s.l: s.n.].

MEERTS, P. *et al.* Correlation Between Type of Adaptive Immune Response Against Porcine Circovirus Type 2 and Level of Virus Replication. **Viral Immunology**, v. 18, n. 2, p. 333–341, jun. 2005.

MIOTTO, R. *et al.* Genotype Detection of Circovirus Type 2 (PCV2) in Swine Clinical Samples from Brazil. 2023.

MOLOSSI, F. A. *et al.* A putative PCV3-associated disease in piglets from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 491–498, 6 mar. 2022.

NAWAGITGUL, P. *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 9, p. 2281–2287, 1 set. 2000.

NAYAR G P; HAMEL A; LIN L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Pode Vet J.**, v. 38, p. 385–386, jun. 1997.

NGUYEN, V. *et al.* Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 2, p. 538–548, 21 mar. 2022.

NIELSEN, G. B. *et al.* Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. **Porcine Health Management**, v. 4, n. 1, p. 2, 1 dez. 2018.

OLIVER-FERRANDO, S. *et al.* Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 121, 3 dez. 2016.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.-J.; HALBUR, P. G. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 6, p. 591–615, 25 nov. 2007.

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

PARK, K. H. *et al.* Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 87–92, abr. 2019.

PATTERSON, R. *et al.* Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV2b. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3–4, p. 261–269, jun. 2015.

PÉREZ, E. *et al.* Safety of the Administration of an Inactivated PCV2a/PCV2b/Mycoplasma Hyopneumoniae Vaccine to Pregnant and Lactating Sows and Gilts. **Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1483, 14 set. 2023.

PHAN, T. G. *et al.* Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 184, 11 dez. 2016.

POULSEN NAUTRUP, B. *et al.* Do High Levels of Maternally Derived Antibodies Interfere with the Vaccination of Piglets against Porcine Circovirus Type 2? A Literature Review and Data Analysis. **Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 923, 19 ago. 2021.

PRICKETT, J. R. *et al.* **Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections** *Journal of Swine Health and Production*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.aasv.org/shap.html>>.

ROSE, N. *et al.* Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, n. 1–2, p. 78–89, mar. 2012.

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

SACHSE, K. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. Em: **PCR Detection of Microbial Pathogens**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 03–30.

SAPORITI, V. *et al.* Detection and genotyping of Porcine circovirus 2 (PCV-2) and detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in sera from fattening pigs of different European countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2521–2531, 14 nov. 2020.

SAPORITI, V. *et al.* Porcine circovirus 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 2936–2948, 8 nov. 2021.

SARAIVA, G. *et al.* Retrospective Detection and Genetic Characterization of Porcine circovirus 3 (PCV3) Strains Identified between 2006 and 2007 in Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 201, 27 fev. 2019.

SEGALÉS, J. *et al.* Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 151–158, fev. 2004.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, n. 1–2, p. 10–19, mar. 2012.

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

SIBILA, M. *et al.* Humoral response and colostral antibody transfer following ‘one-dose’ pre-mating vaccination of sows against porcine circovirus type-2. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 881–883, set. 2013.

SIRISEREEWAN, C. *et al.* Molecular detection and genetic characterization of porcine circovirus 4 (PCV4) in Thailand during 2019–2020. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5168, 30 mar. 2023.

TISCHER, I. *et al.* **Archives of Virology Studies on Epidemiology and Pathogenicity of Porcine Circovirus** Arch Virol. [s.l: s.n.].

TOCHETTO, C. *et al.* 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, fev. 2018.

TURLEWICZ-PODBIELSKA, H.; AUGUSTYNIAK, A.; POMORSKA-MÓL, M. Novel Porcine Circoviruses in View of Lessons Learned from Porcine Circovirus Type 2-Epidemiology and Threat to Pigs and Other Species. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 261, 27 jan. 2022.

WANG, D. *et al.* Current knowledge on epidemiology and evolution of novel porcine circovirus 4. **Veterinary Research**, v. 53, n. 1, p. 38, 31 dez. 2022.

WANG, Y. *et al.* Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 3, p. 1284–1294, 16 maio 2020.

WU, G. *et al.* BOARD-INVITED REVIEW: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2316–2337, 1 set. 2006.

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

XU, Q. *et al.* Epidemiology and Genetic Diversity of PCV2 Reveals That PCV2e Is an Emerging Genotype in Southern China: A Preliminary Study. **Viruses**, v. 14, n. 4, p. 724, 30 mar. 2022.

ZHAI, S.-L. *et al.* Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 222, 13 dez. 2017.

ZHANG, H. H. *et al.* Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 3, p. 1057–1061, 1 maio 2020.

ZHAO, K. *et al.* Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 374, 31 dez. 2010.

ZHENG, S. *et al.* The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, p. 1337–1341, out. 2017.

## 8. ANEXO

**Anexo 1:** Questionário abrangente aplicado aos produtores de suínos, enfatizando práticas de biossegurança e vacinação.

| <b>Granjas</b>                                       | <b>G1</b>                    | <b>G2</b>                    | <b>G3</b>                    | <b>G4</b>                    | <b>G5</b>                    | <b>G6</b>                    | <b>G7</b>                    | <b>G8</b>                    | <b>G9</b>                    |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Distância até granja mais próxima (km) - via estrada | 8                            | 2,2                          | 3,8                          | 7,3                          | 4,2                          | 4,2                          | 9,9                          | 6                            | 0,95                         |
| Número de granjas a um raio de 6km                   | 2                            | 5                            | 5                            | 2                            | 1                            | 3                            | 2                            | 3                            | 2                            |
| Sistema de produção                                  | ciclo completo - único sítio |
| Cerca viva ou Mata                                   | sim                          | sim                          | não                          | sim                          | sim                          | não                          | sim                          | não                          | não                          |
| Sinalização de proibição de entrada                  | sim                          |
| Estacionamento próximo às baias                      | não                          | não                          | sim                          | sim                          | sim                          | não                          | sim                          | não                          | sim                          |
| Embarcadouro próximo às baias                        | sim                          | não                          | sim                          | sim                          | sim                          | não                          | não                          | sim                          | sim                          |

|  |        |       |        |        |        |        |        |          |          |
|--|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|
| Vazio Sanitário<br>(Exigência para<br>visitantes)              | não    | não   | não    | não    | não    | sim    | não    | não      | não      |
| Livro de Visitas   | não    | não   | não    | não    | não    | não    | não    | não      | não      |
| Troca de roupa para<br>entrada na granja                       | sim    | não   | sim    | sim    | sim    | sim    | sim    | não      | sim      |
| Banho para entrada na<br>granja                                | não    | não   | não    | não    | não    | sim    | não    | não      | não      |
| Presença de outras<br>espécies animais na<br>granja            | sim    | sim   | sim    | NA     | NA     | não    | sim    | sim      | NA       |
| Utiliza de rodolúvio e<br>arcolúvio                            | não    | não   | não    | não    | não    | não    | não    | não      | não      |
| Limpeza geral de<br>arredores frequente,<br>(entulhos e matos) | sim    | não   | sim    | sim    | sim    | sim    | sim    | sim      | sim      |
| Último treinamento de<br>vacinação                             | <1 ano | <1ano | >5anos | >1 ano | >5anos | 1,5ano | >2anos | não teve | não teve |

| Vacina de circovirose utilizada        | A             | B               | A                          | C  | D                               | A e C   | D                        | A              | E                             |
|--|---------------|-----------------|----------------------------|--|---------------------------------|---|--------------------------|----------------|-------------------------------|
| Esquema de vacinação – Leitões (média) | 21 dias (1ml) | 21 dias (0,5ml) | 21 dias (1ml)              | 21 dias (2ml) e                          | 21 dias (2ml) e 42 dias (2ml)   | 40 dias A (1ml) e 60 dias C (0,5ml)   | 20 dias (2ml)            | 26 dias (1ml)  | 21 dias (1ml) e 47 dias (1ml) |
| Esquema de vacinação – Leitoas (média) | NA            | NA              | 150 dias ou 160 dias (1ml) | 150 dias (2ml) e 190 dias (2ml)          | Recebe leitoa já vacinada       | 26 dias após a chegada na granja aplica a vacina A (1ml) e 160 dias C (2ml) | 150 dias (2ml)           | 180 dias (1ml) | 190 dias (1ml)                |
| Esquema de vacinação – Porcas (média)  | NA            | NA              | 10 dias pós-parto (1ml)    | 7 dias pós-parto (2ml) - até sexto parto | 80 e 100 dias de gestação (2ml) | 90 dias de gestação (1ml)   | 5-7 dias pós-parto (2ml) | não vacina     | 7 dias pós-parto - só leitoa  |
| Correto acondicionamento de vacinas    | não           | não             | não                        | sim                                      | sim                             | sim   | sim                      | sim            | sim                           |

|   |                               |                       |                               |  |                |                |  |                |                |
|---|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|--|----------------|----------------|--|----------------|----------------|
| Retorno de frasco para conservadora/geladeira   | sim                           | sim                   | sim                           | NA   | sim            | não            | não                                      | sim            | não            |
| Granja livre de <i>Mycoplasma Hyo</i>   | não                           | não                   | não                           | não  | não            | sim            | não                                      | não            | não            |
| Problemas clínicos prevalentes (nenhuma das granjas com mortalidade considerada alta >1,5% em nenhuma fase) | granja estável sanitariamente | circovirus e / manejo | granja estável sanitariamente | sanitário, sem diagnóstico definido (animais com baixo desempenho na creche) | granja estável | granja estável | desafio creche, sem diagnóstico definido | granja estável | granja estável |
| Taxa de Parição (%)   | 95,57                         | NA                    | 90,86                         | NA   | NA             | NA             | NA                                       | NA             | NA             |
| Média de Nascidos total   | 17,59                         | NA                    | 16,29                         | NA   | NA             | NA             | NA                                       | NA             | NA             |
| Média de Nascidos Vivos   | 15,89                         | NA                    | 14,82                         | NA   | NA             | NA             | NA                                       | NA             | NA             |
| Taxa de Mumificados/Parto (%)   | 3,23                          | NA                    | 2,28                          | NA   | NA             | NA             | NA                                       | NA             | NA             |



---

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MATERNIDADE -<br>Maternidade tem mais<br>de 15 porcas/sala<br>(disseminação de<br>patógenos) | sim |
| MATERNIDADE - Todos<br>dentro todos fora   | sim |
| CRECHE - Todos dentro<br>todos fora  | sim |
| CRECHE - Limpeza do<br>ambiente e animais  | sim |
| CRECHE - Permite<br>contato dos animais<br>entre baias                                       | sim | sim | sim | sim | sim | não | sim | não | não |
| CRECHE - Densidade<br>populacional adequado  | sim | não | sim | não | sim | sim | sim | sim | sim |

---



---

|  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TERMINAÇÃO -<br>Densidade populacional<br>adequado | sim | não | sim | sim | sim | sim | sim | sim | não |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

---

|   |        |       |        |    |       |     |     |     |       |
|---|--------|-------|--------|----|-------|-----|-----|-----|-------|
| REPOSIÇÃO - Origem<br>dos animais (todos<br>oriundos de empresa de<br>genética) | bisavó | marrã | bisavó | NA | marrã | avó | avó | avó | marrã |
|---|--------|-------|--------|----|-------|-----|-----|-----|-------|

---

|  |    |     |    |     |     |     |     |     |     |
|--|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| REPOSIÇÃO -<br>Quarentena na entrada<br>de animais | NA | não | NA | não | não | não | não | não | não |
|--|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

---