



Genótipos de Circovírus Suíno Tipo 2 e PCV3 em Amostras Clínicas de Suínos no Brasil

Porcine Circovirus Type 2 Genotypes and PCV3 in Swine Clinical Samples From Brazil

Rovian Miotto¹ , Caroline Pissetti² , Luiz Carlos Bordin³ , Janice Reis Ciacci Zanella^{*3} 

¹Instituto Federal Catarinense (IFC), Concórdia, Santa Catarina, Brasil

²Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), Concórdia, Santa Catarina, Brasil

³Embrapa Suínos e Aves (CNPISA), Concórdia, Santa Catarina, Brasil

*autor correspondente: janice.zanella@embrapa.br

Resumo: O Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um importante patógeno para suínos e causador das doenças associadas a circovirose suína (PCVD). Apesar da PCVD ser controlada pelas vacinas comerciais, a sua apresentação está mudando. Além disso, o PCV2 está evoluindo geneticamente e novos genótipos foram identificados em suínos vacinados e não vacinados. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença dos genótipos PCV2a, PCV2b e PCV2d em amostras previamente positivas para PCV2. Além disso, identificar coinfeções entre genótipos de PCV2 e/ou com PCV3, que também podem causar doenças em suínos, utilizando um teste de diagnóstico PCR rápido, eficaz e de baixo custo. Foram analisadas 333 amostras clínicas positivas para PCV2 por qPCR e provenientes de diferentes fases de produção e rebanhos do Brasil. Destas, 266 foram genotipadas, sendo o PCV2b o genótipo mais predominante (56,77% das amostras positivas), principalmente provenientes de animais da creche. O PCV2d também foi detectado em 33,10% das amostras, principalmente em suínos de terminação e porcas reprodutoras. O teste PCR utilizado neste estudo foi comparado a um kit comercial e foi eficaz na genotipagem do PCV2. Este estudo demonstrou a importância da genotipagem do PCV2 e que o PCV2b continua sendo o genótipo predominante responsável pela doença em granjas de suínos no Brasil. O PCV2a, genótipo mais comum utilizado nas vacinas comerciais, não foi detectado em nenhuma amostra analisada. Embora os suínos infectados com outros genótipos de PCV2 possam obter alguma proteção heteróloga das vacinas contra PCV2a, diagnósticos adequados e monitoria da vacina para atualizações devem ser considerados.

Palavras-chave: Genotipagem; PCV2a; PCV2b; PCV2d.

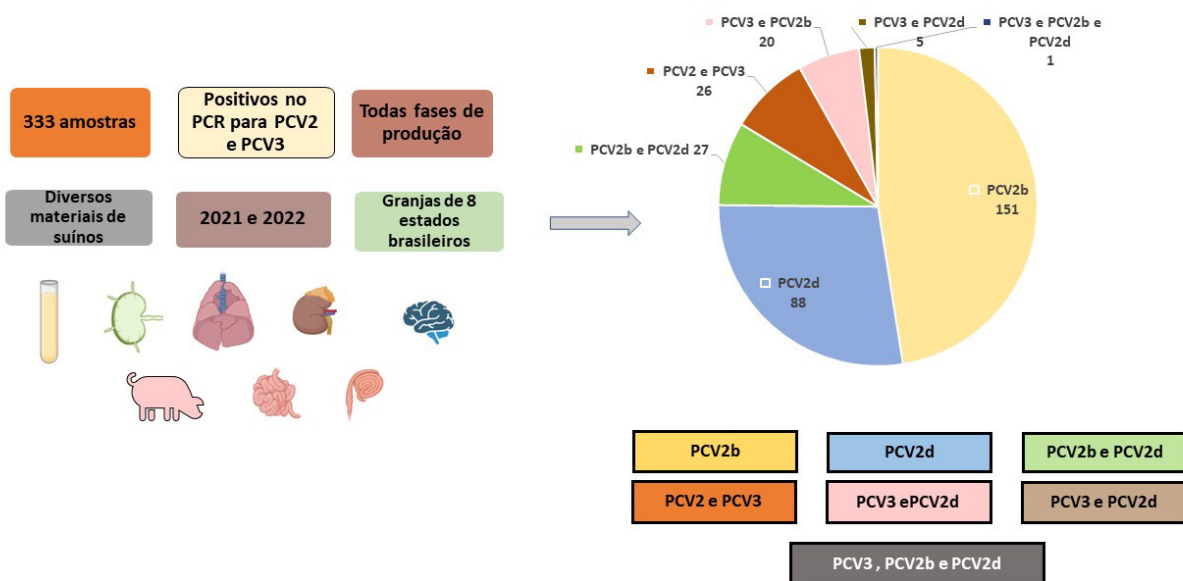
Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2), an important pathogen in swine, causes PCV disease (PCVD). Although PCVD is effectively controlled using commercial vaccines, its clinical presentation is changing. Moreover, PCV2 is genetically evolving, with new genotypes emerging in vaccinated or unvaccinated pigs. In this study, we aimed to verify the presence of the PCV2a, PCV2b, and PCV2d genotypes in PCV2-positive porcine samples. Furthermore, to identify coinfections between the PCV2 genotypes and/or PCV3, which can also induce disease in pigs, we employed a quick, effective, and low-cost PCR diagnostic test. In this study, 333 PCV2 qPCR and clinically positive samples from various production stages and herds across Brazil were analyzed. Among these, 266 samples were genotyped, with PCV2b

Recebido: 20 de novembro, 2023. Aceito: 19 de abril, 2024. Publicado: 15 de julho, 2024.

emerging as the most predominant genotype (56.77% of the positive samples), mainly observed in nursery pigs. PCV2d was also identified in 33.10% of the samples, primarily from finishing pigs and breeding sows. The employed PCR test was compared with a commercial kit, proving effective in PCV2 genotyping. This study demonstrates the significance of PCV2 genotyping, showing PCV2b as the most predominant genotype responsible for disease in pig farms in Brazil. PCV2a, the prevalent genotype used in commercial vaccines, was not detected in any of the analyzed samples. While pigs infected with other PCV2 genotypes may receive some heterologous protection from PCV2a vaccines, adequate diagnosis and vaccine monitoring for updates must be considered.

Keywords: Genotyping; PCV2a; PCV2b; PCV2d

Resumo gráfico



1. Introdução

Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é o agente etiológico das doenças associadas a circovirose suína (PCVD). O PCV2 foi identificado em 1998 em tecidos de suínos que sofriam de síndrome multissistêmica de ausência de crescimento pós-desmame (PMWS)^(1, 2), uma síndrome inicialmente observada em animais saudáveis no Canadá em 1995. Desde então, o PCV2 tem sido associado a diversas manifestações clínicas, incluindo doenças sistêmicas, entéricas, respiratórias e reprodutivas, assim como a dermatite suína e síndrome de nefropatia, que agora são reconhecidas como doença associada ao PCV2, PCVAD ou PCVD^(3, 4). PMWS é a manifestação clínica mais prevalente e severa da infecção por PCV2, sendo caracterizada por perdas e lesões graves no tecido linfóide, classificadas como sistêmicas ou subclínicas. Embora a infecção pelo PCV2 tenha sido identificada pela primeira vez no ano 2000⁽⁵⁾, estudos retrospectivos demonstraram que o vírus já estava presente desde 1978⁽⁶⁾. Desde a sua detecção inicial, a infecção por PCV2 tem sido amplamente distribuída nos rebanhos suínos brasileiros causando perdas sanitárias e de produção⁽⁷⁾. Embora a PCVD possa ser controlada através da correção dos fatores de risco e pelo uso de vacinas⁽⁴⁾, ela continua sendo um desafio no Brasil, principalmente devido às mudanças na sua apresentação.

O PCV2 pertence ao gênero *Circovirus* da família *Circoviridae* ⁽⁴⁾, e é o menor vírus de DNA de fita simples com replicação autônoma, não envelopada e circular⁽¹⁾. A evolução deste genótipo nos últimos anos tem sido caracterizada por surtos severos de PCVD, relatados na América do Norte de 2004 a 2006. Durante este período, o genoma dos isolados de PCV2 encontrados nos rebanhos afetados foi comparado com os isolados previamente encontrados⁽⁸⁻¹⁰⁾. Mais tarde, uma nova variante do PCV2 foi detectada em rebanhos previamente vacinados contra o agente na América do Norte, China, Brasil e em outros países produtores de suínos⁽¹¹⁻¹³⁾. Esta evolução esteve associada a falhas da vacina de PCV2. No Brasil, um mutante de PCV2 associado a falhas vacinais foi identificado pela primeira vez em 2012, e a cepa viral era muito semelhante à encontrada na China entre 2004 e 2008⁽¹³⁾. O vírus foi isolado de suínos vacinados contra PCV2 que apresentavam sinais clínicos típicos de PCVD e diagnóstico laboratorial positivo para PCV2. As análises genômicas revelaram adições ou substituições de nucleotídeos resultando em modificações no genoma do vírus, denominado mPCV2. Estas alterações, por sua vez, induziram alterações em aminoácidos localizados nos epítomos responsáveis pela ativação do sistema imunológico. No final da sequência ORF2 (*open reading frame 2*) para a proteína do capsídeo viral, a variante apresentou nucleotídeos adicionais para três aminoácidos extras⁽¹³⁾.

Devido a alta variabilidade genômica observada no PCV2, os isolados foram categorizados em nove genótipos, variando de PCV2a a PCV2i, com base na ORF2 ou sequências completas do genoma⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Atualmente existem inúmeras vacinas comerciais disponíveis, sendo a maioria delas baseadas no genótipo "a" (PCV2a)^(4, 17). Porém, com o aumento da diversidade genotípica circulante, estão sendo consideradas vacinas mais eficazes que incorporem atualizações e/ou incluam novos genótipos ⁽¹⁷⁾. Além do PCV2, muitas doenças relacionadas ao PCVD envolvem outros agentes (por exemplo, circovírus suíno tipo 3, PCV3), agravando os casos clínicos⁽⁸⁾. Assim, a investigação de coinfeções por PCV3 e PCV2, incluindo a genotipagem, é essencial nos casos de PCVD clínica^(18, 19).

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, sendo considerado importante no cenário internacional^(20, 21). Apesar da importância da produção suína no Brasil, com mais de 2 milhões de porcas alojadas e 5 milhões de toneladas de carne suína produzidas em 2022⁽²¹⁾, poucos laboratórios realizam análises moleculares, especialmente análises especializadas como a genotipagem viral⁽²²⁾. Isto dificulta aos médicos veterinários a interpretação de casos clínicos, especialmente quando as vacinas são utilizadas para controlar doenças como a PCVD. Considerando os prejuízos causados pela infecção por PCV2 na produção suína a nível mundial e o impacto econômico gerado, bem como a detecção de PCV2 em rebanhos vacinados, os objetivos deste trabalho foram caracterizar genótipos de PCV2 para avaliar a presença de PCV2a, PCV2b e PCV2d no campo, por região, fase de produção e material coletado, utilizando um método de diagnóstico rápido, de baixo custo e eficaz. Além disso, a presença de coinfeções entre os genótipos e PCV3 também foi investigada nas amostras analisadas.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras analisadas

Trezentas e trinta e três amostras de casos clínicos suspeitos de PCVD submetidas ao Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA) entre 2021 e 2022, provenientes de oito estados brasileiros (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) foram utilizados neste estudo. As amostras foram coletadas de diferentes órgãos e materiais de acordo com condições clínicas e compatibilidade com lesões de PCVD. As amostras incluíram 105 amostras de soro, 10 amostras de útero, quatro amostras de esfregaço retal, três amostras de rim, 50 amostras de pulmão, seis amostras de linfonodos, 31 amostras de intestino, 61 amostras de fetos (que incluíam natimortos e fetos mumificados), duas amostras de cérebro e 58 amostras de pool de órgãos (fígado, rim, pulmão, baço, linfonodos e tecido cardíaco). As amostras foram obtidas através de convênio técnico-científico entre o Centro de Pesquisa Embrapa Suínos e Aves e o CEDISA (Convênio 21000.18/0009-7)⁽²²⁾.

Todas as amostras foram submetidas à detecção de DNA viral de PCV2 ou PCV3 através de PCR em tempo real (qPCR). Para isso, as amostras foram pré-tratadas durante a noite com tampão de lise tecidual (ATL, Qiagen, Venlo, Holanda) e proteinase K (Qiagen, Venlo, Holanda) a 56°C sob agitação. O DNA viral foi extraído usando kit IndiMag Pathogen (Indical Bioscience, Leipzig, Alemanha) com um sistema de extração automatizado da IndiMag 48S (Indical Bioscience, Leipzig, Alemanha). O qPCR para diagnóstico de PCV2 foi realizado visando a amplificação de uma região do gene *Cap* (ORF2) utilizando os primers específicos PCV2_F (5'-CCA GGA GGG GCG TTG TGA CT-3') e PCV2_R (5'-CGC TAC CGT TGG AGA AGG AA-3') e a sonda PCV2_S (5'-AAT GGC ATC TTC AAC ACC CGC CT CT-3'), como já descrito⁽²³⁾. Para a reação de qPCR, 2,5 µL do DNA extraído foi adicionado ao master mix GoTaq® Probe qPCR (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1,25 µM e 0,5 µM dos primers e sonda, respectivamente. Para PCV3, o gene de replicação conservado foi detectado utilizando os primers PCV3_535_F (5'-TGA CGG AGA CGT CGG GAA AT-3') e PCV3_465_R (5'-CGG TTT ACC CAA CCC CAT CA-3'), e a sonda PCV3_535_F (5'-TGA CGG AGA CGT CGG GAA AT-3'), conforme descrito em estudo⁽¹⁴⁾. Para a reação, 2 µL do DNA extraído foi adicionado ao master mix GoTaq Probe qPCR (Promega Corporation, Madison, WI, USA), com 0,8 µM e 0,4 µM dos primers específicos e sonda, respectivamente. O sinal de fluorescência foi detectado no final de cada ciclo de extensão no termociclador QuantStudio™ Flex 6 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as amostras que apresentaram Ct < 38,00 em ambos os testes foram consideradas positivas.

2.2 Controles positivos de DNA de PCV2 para genotipagem

Para encontrar controles positivos para cada genótipo, 20 amostras foram selecionadas aleatoriamente e submetidas ao sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada com primers previamente descritos⁽²⁴⁾, visando amplificar a região ORF2 do PCV2. Após a

análise do sequenciamento genômico, foi possível selecionar amostras de controle positivo para os genótipos PCV2b e PCV2d. Para o genótipo PCV2a foi utilizada uma amostra de referência previamente sequenciada da “Coleção de microrganismos de interesse para suínos e aves” (CMISEA) da Embrapa Suínos e Aves⁽¹³⁾. As amostras sequenciadas foram testadas para validação dos ensaios de PCR convencional (cPCR). Os resultados dos testes de controle positivo estão ilustrados na Figura 1.

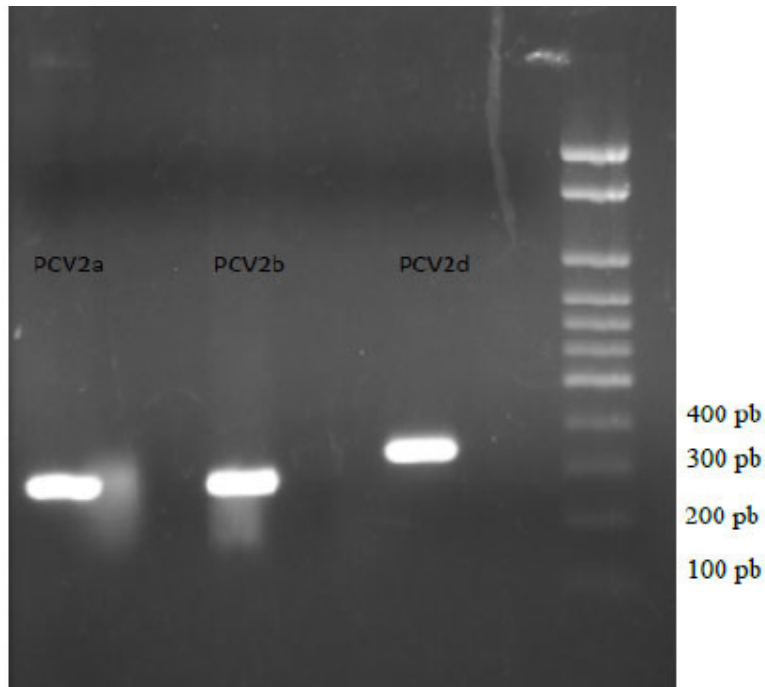


Figura 1 Gel de eletroforese mostrando os produtos de DNA amplificados para os genótipos de PCV2, com seu peso molecular: PCV2a com 277 pb, PCV2b com 277 pb e PCV2d com 343 pb

2.3 PCR convencional (cPCR) utilizado para genotipagem de PCV2

Cada amostra foi testada individualmente para cada um dos três genótipos de interesse do PCV2. A reação de cPCR foi baseada na região ORF2 do PCV2, região que apresenta maiores taxas de diversidade. As sequências dos primers utilizados⁽²⁵⁻²⁷⁾ estão descritas na Tabela 1. Os primers foram diluídos para 10 pmol e a PCR utilizou 2,5 µl de tampão, 1 µl com 25 mmol de MgCl₂, 1 µl de dNTPs, 0,6 µl de cada primer e 2 µl de DNA de cada amostra. As condições de PCR utilizadas foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min⁽²⁵⁻²⁷⁾. Os produtos de cPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio a 2%. Devido o tamanho idêntico do produto dos genótipos PCV2a e PCV2b, cada amostra foi submetida separadamente em cada reação de cPCR, possibilitando assim a distinção dos genótipos.

Tabela 1 Primers utilizados na análise de genotipagem de PCV2.

| Primer | Sequência de nucleotídeos (5'-3') | Tamanho do produto |
|------------|-----------------------------------|--------------------|
| PCV2ab - F | GGT TGG AAG TAA TCA ATA GTG GA | 277 pb |
| PCV2a - R | GGG GAA CCA ACA AAA TCT C | |
| PCV2ab - F | GGT TGG AAG TAA TCA ATA GTG GA | 277 pb |
| PCV2b - R | GGG GCT CAA ACC CCC GCT C | |
| PCV2d - F | GGT TGG AAG TAA TCG ATT GTC CT | 343 pb |
| PCV2d - R | TCA GAA CGC CCT CCT GGA AT | |

Tabela 1 Sequência de nucleotídeos dos primers forward (F) e reverse (R) e tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb).

2.4 Genotipagem de PCV2 utilizando kit comercial por qPCR

Dezoito amostras foram submetidas a genotipagem utilizando um kit comercial de qPCR (Kylt® PCV-2 Typing kit, SAN Group Biotech, Höltinghausen, Alemanha). Os resultados foram comparados com os obtidos no cPCR para avaliar a sensibilidade e especificidade. O kit comercial é um PCR multiplex em tempo real e diferencia o DNA viral de PCV2a, PCV2b e PCV2d. Os resultados positivos ou negativos de cada amostra, incluindo as coinfeções, foram submetidos ao teste Kappa de Cohen para avaliar a concordância entre os dois testes.

2.5 Comitê de ética

Todas as amostras de DNA já extraídas utilizadas neste estudo foram cedidas pelo laboratório do Centro de Diagnóstico de Saúde Animal (CEDISA) em Concórdia, Brasil de casos positivos de PCV2 e PCV3, não sendo necessário aprovação de comitê de ética.

3. Resultados

PCV2a, PCV2b, ou PCV2d foram detectados em 266 das 333 amostras testadas que foram submetidas a genotipagem, mas a detecção do genótipo não foi viável em 67 amostras, conforme mostrado na Tabela 2. De todas as 266 amostras genotipadas, 151 foram positivas para PCV2b (51,7%), 88 para PCV2d (30,1%) e 27 amostras apresentaram coinfeção para PCV2b e PCV2d (9,2%). Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para PCV2a.

Tabela 2 Frequência e genótipos de PCV2 nas amostras analisadas.

| Amostra ou tecido | Número de amostras analisadas | Positivo para PCV2b | Positivo para PCV2d | Positivo para PCV2b e PCV2d (coinfeção) |
|-------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|---|
| Órgãos (pool) | 52 | 41 (78,85%) | 9 (17,30%) | 2 (3,85%) |
| Cérebro | 2 | 2 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Fetos | 40 | 29 (72,5%) | 10 (25%) | 1 (2,5%) |

| | | | | |
|--------------------|----|-------------|-------------|-------------|
| Fezes | 3 | 3 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Intestino | 29 | 13 (44,82%) | 13 (44,82%) | 3 (10,34%) |
| Linfonodos | 6 | 6 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Pulmão | 44 | 28 (63,63%) | 13 (29,54%) | 3 (6,81%) |
| Rim | 3 | 2 (66,67%) | 0 (0%) | 1 (33,33%) |
| Soro | 81 | 23 (28,4%) | 43 (53,1%) | 15 (18,51%) |
| Suabe retal | 3 | 1 (33,33%) | 0 (0%) | 2 (66,67%) |
| Útero | 3 | 3 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Tabela 2 Resultados da genotipagem por cPCR de PCV2 nas amostras analisadas (órgãos e fluídos). A tabela apresenta o número de amostras e a percentagem de resultados positivos para cada genótipo ou coinfeção de PCV2.

O PCV2b foi detectado em amostras de cérebro (2/2), linfonodos (6/6), fezes (3/3) e útero (3/3) entre as amostras testadas. Por outro lado, as amostras de soro foram as mais frequentemente positivas para PCV2d, com 43 amostras positivas de um total de 81 amostras positivas (43/81). Portanto, pode-se observar o genótipo PCV2b em todos os tipos de materiais testados. Conforme mostrado na Tabela 2, as amostras de esfregaços retais apresentaram a maior percentagem de coinfeção entre os genótipos PCV2b e PCV2d.

Os oito estados brasileiros cujas amostras foram analisadas respondem por mais de 90% de toda a produção brasileira de carne suína⁽²⁰⁾. A maior parte das amostras foi recebida dos três estados do Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), que representam a maior região produtora de suínos do país. Em relação à distribuição genotípica por estado, o PCV2b foi detectado com maior frequência em amostras do estado do Paraná (61,99%), enquanto o PCV2d foi mais frequente em amostras do estado de São Paulo. No Mato Grosso do Sul, onde foram observadas as maiores taxas de coinfeção entre os dois genótipos (PCV2b e PCV2d), e onde a genotipagem foi possível em 100% das amostras testadas (Figura 2).

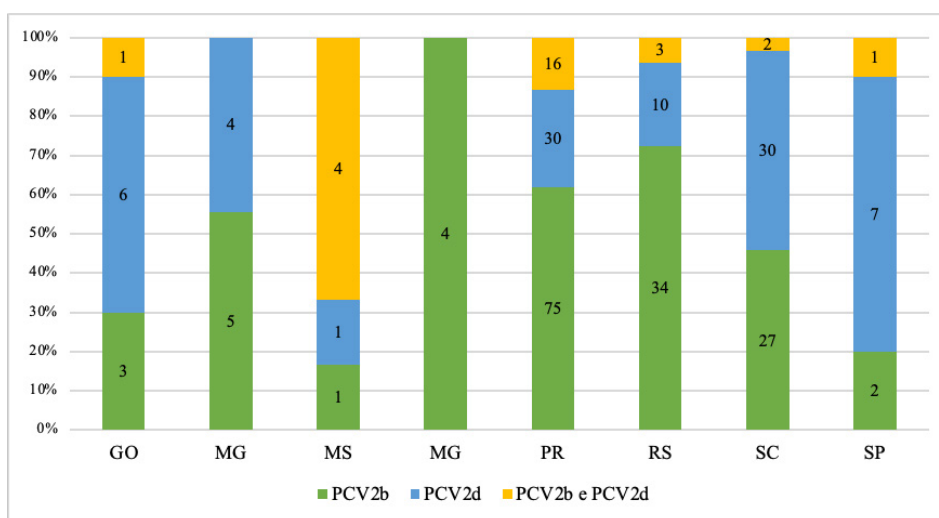


Figura 2 Detecção do genótipo PCV2 por amostra por cada estado brasileiro, mostrando o genótipo mais frequente em cada amostra.

Em relação à fase de produção, a fase de terminação apresentou o maior número de amostras genotipadas, na qual o PCV2d foi o genótipo mais frequentemente detectado em

62 amostras, enquanto o PCV2b foi detectado em 41 amostras. Além disso, o PCV2d também foi mais frequente nas amostras de porcas. Na fase de creche, o genótipo mais frequente foi o PCV2b, presente em 51 amostras, enquanto o PCV2d foi detectado em 11 amostras. As maiores taxas de coinfeção de PCV2b e PCV2d foram encontradas nas amostras da fase de terminação, totalizando 20 amostras. As maiores taxas de PCV2b foram encontradas em amostras que não foram informadas em que fase de produção se encontravam, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 Detecção de genótipos de PCV2 por fase de produção, com os genótipos mais frequentes e o número total de amostras positivas.

| Fase de produção | Número de amostras analisadas | Positivo para PCV2b | Positivo para PCV2d | Positivo para PCV2b e PCV2d (coinfeção) |
|---------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|---|
| Suínos de reposição | 12 | 8 (66,67%) | 1 (8,33%) | 3 (25%) |
| Porcas | 9 | 3 (33,33%) | 5 (55,56%) | 1 (11,11%) |
| Gestação | 4 | 2 (50%) | 2 (50%) | 0 (0%) |
| Maternidade | 24 | 17 (70,83%) | 6 (25%) | 1 (4,16%) |
| Creche | 64 | 51 (79,68%) | 11 (17,18%) | 2 (3,12%) |
| Terminação | 119 | 42 (35,3%) | 57 (47,9%) | 20 (16,8%) |
| Não informado | 34 | 28 (82,35%) | 6 (17,65%) | 0 (0%) |

Tabela 3 Resultados do genótipo de PCV2 por cPCR por fase de produção de suínos. A tabela apresenta o número de amostras analisadas considerando a origem da amostra e o percentual de resultados positivos para cada genótipo ou coinfeção de PCV2.

3.1 Ocorrência de genótipos de PCV2 e/ou coinfeção por PCV3

Vinte e sete amostras apresentaram coinfeção entre os genótipos PCV2b e PCV2d, representando 9,2%. Entretanto, não foi encontrada nenhum outro tipo de coinfeção entre os genótipos de PCV2; a maioria das coinfeções foi encontrada em amostras obtidas de suabes, representando 66,67% das amostras positivas. Além disso, foram encontradas coinfeções com PCV3 em 26 amostras, tanto para PCV2 como para PCV3, o que representa 8,9%. As amostras de fetos apresentaram maior positividade para coinfeção entre PCV2 e PCV3. Além disso, foi observada maior presença de amostras do genótipo “b” nessas coinfeções, com 20 amostras positivas para PCV2b e 5 amostras positivas para PCV2d. Apenas uma amostra apresentou positividade para coinfeção entre PCV2b, PCV2d e PCV3 (dados não mostrados).

3.2 Avaliação da concordância entre os dois testes para genotipagem de PCV2

Foram escolhidas 18 amostras aleatoriamente, testadas com o kit comercial (Kylt® PCV-2 Typing) e comparadas com cPCR. Os achados indicaram que a maioria das amostras apresentou coinfeção entre os genótipos (Tabela 4). Os resultados foram submetidos ao teste Kappa para avaliar a concordância entre os testes (Tabela 5).

Tabela 4 Comparação entre os dois testes de genotipagem para PCV2.

| Amostra | PCR convencional | Kit comercial |
|---------|------------------|---------------|
| 1 | PCV2b | PCV2b |
| 2 | PCV2b | PCV2b e PCV2d |
| 3 | Negativo | Negativo |
| 4 | PCV2b e PCV2d | Negativo |
| 5 | Negativo | Negativo |
| 6 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 7 | Negativo | Negativo |
| 8 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 9 | PCV2b e PCV2d | Negativo |
| 10 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 11 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 12 | PCV2b | Negativo |
| 13 | PCV2b | Negativo |
| 14 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 15 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 16 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 17 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |
| 18 | PCV2b e PCV2d | PCV2b e PCV2d |

Tabela 5 Teste estatístico Cohen-Kappa para avaliar a concordância entre os dois testes.

| Genótipo | KAPPA | Acurácia |
|----------|-----------------------|----------|
| PCV2b | 0,478 (0,094 – 0,863) | 77,8 |
| PCV2d | 0,658 (0,308 – 1,000) | 83,33 |
| PCV2 | 0,478 (0,094 – 0,863) | 77,8 |

Tabela 5 Comparação dos resultados de genotipagem de PCV2 por cPCR e teste comercial. O coeficiente de kappa de Cohen considera a possibilidade de concordância entre os dois testes ocorrer por acaso. A tabela mostra a precisão entre os dois testes. O coeficiente varia de -1 a 1, onde 1 indica concordância perfeita e 0 indica concordância que não é melhor que o acaso.

A reação de cPCR foi mais sensível para algumas amostras, resultando na genotipagem bem-sucedida de quatro amostras. Apenas uma amostra (amostra 2) apresentou discrepância entre o kit comercial e o cPCR, sendo que o kit comercial identificou coinfeção (PCV2b e PCV2d), enquanto o teste de cPCR detectou apenas PCV2b. A análise dos dados entre os genótipos e os dois testes revelou resultados consistentes. O teste PCV2b e o PCV2 geral (cPCR e kit comercial) exibiram a mesma acurácia (77,8%). No teste PCV2d a acurácia foi maior (83,33%). O teste kappa apresentou intervalo de confiança maior que 0, indicando que ambos os testes conseguiram identificar os genótipos e mostrar concordância entre eles. Porém, a maior concordância foi encontrada na identificação do PCV2d, por apresentar acurácia e intervalo de confiança maior.

4. Discussão

Neste estudo, analisamos amostras clínicas de diagnóstico de PCVD que previamente apresentaram resultado positivo para PCV2 no laboratório CEDISA, laboratório de diagnóstico de sanidade animal, que recebe amostras para diagnóstico de doenças em suínos de todo o Brasil⁽²²⁾. Para complementar o diagnóstico das granjas vacinadas contra PCV2, porém com sinais de PCVD, no nosso estudo, 79,88% (266/333) das amostras de PCV2 foram genotipadas. Os resultados demonstraram que o PCV2b foi o genótipo predominante detectado em 151 das 266 amostras analisadas. Esta observação concorda com vários estudos a nível mundial, indicando que o PCV2b e o PCV2d são atualmente os genótipos mais prevalentes da infecção por PCV2 em suínos^(11, 28). Além disso, nosso estudo demonstrou que os genótipos PCV2b e PCV2d foram encontrados em amostras de todos os estados brasileiros estudados, confirmando sua ampla ocorrência no país. Curiosamente, apesar da genotipagem de amostras positivas para PCV2 de casos clínicos, o PCV2a não foi detectado. Estudos anteriores demonstraram uma mudança nos genótipos predominantes na produção suína ao longo dos tempos, passando do genótipo PCV2a para PCV2b em 2002⁽²⁹⁾. Além disso, em 2012, ocorreu outra mudança de PCV2b para PCV2d^(4, 13, 17). É importante lembrar que as vacinas baseadas em PCV2a são as mais utilizadas nos rebanhos suínos brasileiros (M. Donin, comunicação pessoal).

As coinfeções entre genótipos PCV2b e PCV2 estão se tornando mais frequentes^(15, 17, 28, 30), e o mesmo foi observado em 27 amostras do nosso estudo. Também foi possível observar coinfeção com PCV3 em nosso estudo em 26 amostras. Novamente, este resultado está de acordo com estudos realizados em outros países, nos quais também foi possível identificar coinfeção entre PCV2 e PCV3^(16, 17, 31). Contudo, nenhum dos estudos citados descreve qual genótipo do PCV2 foi predominantemente envolvido nas coinfeções com PCV3.

As amostras de linfonodos fornecem uma boa indicação de como está a infecção por PCV2 nas granjas de suínos⁽³²⁾. Em nosso estudo, a genotipagem foi possível para todas as amostras de linfonodos recebidas. Além do diagnóstico cuidadoso no momento da avaliação dos animais, a utilização de amostras de alta qualidade é de extrema importância. O PCV2b foi detectado em todos os tipos de amostras recebidas, indicando o seu papel na infecção sistêmica em animais. Por outro lado, o PCV2d foi detectado em amostras de pulmão, feto, intestino e soro. Um achado importante observado neste estudo foi a identificação de PCV2b em amostras de cérebro de suínos na terminação, porém as lesões cerebrais causadas pelo PCV2 podem ser ocasionais⁽⁴⁾. No nosso estudo não foi possível correlacionar os sintomas clínicos apresentados pelos animais com o genótipo do PCV2 detectado.

O genótipo PCV2d foi o mais predominante na fase de terminação. Este resultado é consistente com um estudo realizado na Coreia do Sul, no qual foi encontrada uma maior prevalência de PCV2d em linfonodos de suínos no momento do abate⁽³²⁾. Por outro lado, na fase de creche, o PCV2b foi o genótipo mais comum. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a encontrar esses dados e buscar uma correlação entre genótipo e fase de produção.

A terminação foi a fase em que foi possível obter e genotipar mais amostras previamente positivas para PCV2. Isto deve-se provavelmente à queda na imunidade da vacina e na imunidade materna, tornando os suínos mais susceptíveis às infecções por PCV2⁽³²⁾.

5. Conclusão

A genotipagem do PCV2 é importante para compreender o genótipo predominante em cada granja e discriminá-los, auxiliando no controle da doença e na monitoraria da eficácia da vacina. O PCV2b continua sendo o genótipo predominante nas granjas, juntamente com um aumento na detecção do genótipo PCV2d nas amostras avaliadas. É importante salientar a existência de coinfeções entre genótipos, incluindo coinfeção com PCV3. Com base nestes dados, deve ser dada maior atenção ao monitoramento da eficácia das vacinas e ao surgimento da doença clínica por circovírus. Assim, é importante estudar a evolução genética do PCV2 e avaliar a atualização das vacinas existentes no mercado, considerando a alta taxa de mutação apresentada pelo vírus. O controle da doença por circovírus deve combinar o uso adequado de vacinas com medidas de biossegurança e manejo sanitário, buscando melhorar a saúde dos suínos.

Declarações de conflito de interesse:

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Disponibilidade de dados:

Os dados gerados nesta pesquisa estão publicados aqui e também podem ser solicitados aos autores.

Contribuições dos autores

Rovian Miotto: Metodologia, Curadoria dos dados, Escrita – Preparação do rascunho original, Validação, Análises dos dados. Caroline Pissetti: Metodologia, Curadoria dos dados, Validação, Recursos. Luiz Carlos Bordin: Investigação, Recursos. Janice Reis Ciacci Zanella: Supervisão, Conceitualização, Metodologia, Recursos, Escrita – Revisão e Edição, Administração do projeto, Aquisição de financiamento.

Referências

1. Allan G, McNeilly F, Cassidy J, Reilly G, Adair B, Ellis W, et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary microbiology*. 1995;44(1):49-64. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00136-K](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00136-K)
2. Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian veterinary journal*. 1998;39(1):44. [canvetj00147-0046.pdf \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/101470046/)
3. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19(6):591-615. <https://doi.org/10.1177/104063870701900601>
4. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Circoviruses. *Diseases of swine*. 2019:473-87. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch30>

5. Ciacci-Zanella J, Mores N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 2003;55(5):522-7. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352003000500002>
6. Silva FMFd, Silva Júnior A, Peternelli EFdO, Viana VW, Chiarelli Neto O, Fietto JLR, et al. Retrospective study on Porcine circovirus-2 by nested pcr and real time pcr in archived tissues from 1978 in brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42:1156-60. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822011000300039>
7. Zanella JRC, Morés N, Barcellos DESNd. Main endemic health threats in the swine production chain in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2016;51(5):443-53. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500004>
8. Opriessnig T, Meng X-J, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007;19(6):591-615. <https://doi.org/10.1177/104063870701900601>
9. Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, et al. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease—2004–2006. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2008;72(3):259. <https://doi.org/10.1136/vr.167.7.260>
10. Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J Virol*. 2012;86(22):12469. <https://doi.org/10.1128/jvi.02345-12>
11. Yao J, Qin Y, Zeng Y, Ouyang K, Chen Y, Huang W, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains between 2002 and 2016 reveals PCV2 mutant predominating in porcine population in Guangxi, China. *BMC veterinary research*. 2019;15:1-11. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1859-z>
12. Opriessnig T, O'Neill K, Gerber PF, de Castro AM, Giménez-Lirola LG, Beach NM, et al. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*. 2013;31(3):487-94. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.030>
13. Gava D, Serrao VHB, Fernandes LT, Cantao ME, Ciacci-Zanella JR, Mores N, et al. Structure analysis of capsid protein of Porcine circovirus type 2 from pigs with systemic disease. *Braz J Microbiol*. 2018;49(2):351-7. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.007>
14. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208585>
15. Lv Q, Wang T, Deng J, Chen Y, Yan Q, Wang D, et al. Genomic analysis of porcine circovirus type 2 from southern China. *Vet Med Sci*. 2020;6(4):875-89. <https://doi.org/10.1002/vms3.288>
16. Wang Y, Noll L, Lu N, Porter E, Stoy C, Zheng W, 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. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67(3):1284-94. <https://doi.org/10.1111/tbed.13467>
17. Opriessnig T, Karuppanan AK, Castro AM, Xiao C-T. Porcine circoviruses: Current status, knowledge gaps and challenges. *Virus research*. 2020;286:198044. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198044>
18. Assao VS, Santos MR, Rosado NCL, Bressan GC, Fietto JLR, Chang YF, 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. *Arch Virol*. 2021;166(5):1463-8. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05032-y>
19. Rodrigues ILF, Cruz ACM, Souza AE, Knackfuss FB, Costa CHC, Silveira RL, et al. Retrospective study of porcine circovirus 3 (PCV3) in swine tissue from Brazil (1967-2018). *Braz J Microbiol*. 2020;51(3):1391-7. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00281-6>
20. ABPA. Brazilian Association of Animal Protein - Annual Report - 2023. 2023 [Available from: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/ABPA.-Annual-Report-2023..pdf>].
21. EMBRAPA. CIAS - Central de Inteligencia de Aves e Suínos Brazil: Embrapa Swine and Poultry; 2023 [Available from: <https://www.embrapa.br/en/suinos-e-aves/cias/estatisticas>].

22. CEDISA. Centro de Diagnostico em Sanidade Animal 2023 [Available from: <http://www.cedisa.org.br/home/>].
23. Sibila M, Rocco C, Franzo G, Huerta E, Domingo M, Nunez JI, et al. Genotyping of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Vaccinated Pigs Suffering from PCV-2-Systemic Disease between 2009 and 2020 in Spain. *Pathogens*. 2021;10(8). <https://doi.org/10.3390/pathogens10081016>
24. Dupont K, Nielsen E, Baekbo P, Larsen L. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary microbiology*. 2008;128(1-2):56-64. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.016>
25. Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus research*. 2008;132(1-2):201-7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.013>
26. Kim S-C, Nazki S, Kwon S, Juhng J-H, Mun K-H, Jeon D-Y, et al. The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea. *BMC veterinary research*. 2018;14:1-9. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1614-x>
27. Kwon T, Lee D-U, Yoo SJ, Sang HJ, Shin JY, Lyoo YS. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Research*. 2017;228:24-9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.015>
28. Mone NK, Clark NJ, Kyaw-Tanner M, Turni C, Barnes TS, Parke CR, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Queensland, Australia. *Aust Vet J*. 2020;98(8):388-95. <https://doi.org/10.1111/avj.12952>
29. Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne M-H, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*. 2007;48(8):811. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.072>
30. Franzo G, Segales J. Porcine Circovirus 2 Genotypes, Immunity and Vaccines: Multiple Genotypes but One Single Serotype. *Pathogens*. 2020;9(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens9121049>
31. Ouyang T, Zhang X, Liu X, Ren L. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*. 2019;11(2):185. <https://doi.org/10.3390/v11020185>
32. Park KH, Chae C. The prevalence of porcine circovirus type 2e (PCV2e) in Korean slaughter pig lymph nodes when compared with other PCV2 genotypes. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68(6):3043-7. <https://doi.org/10.1111/tbed.13975>