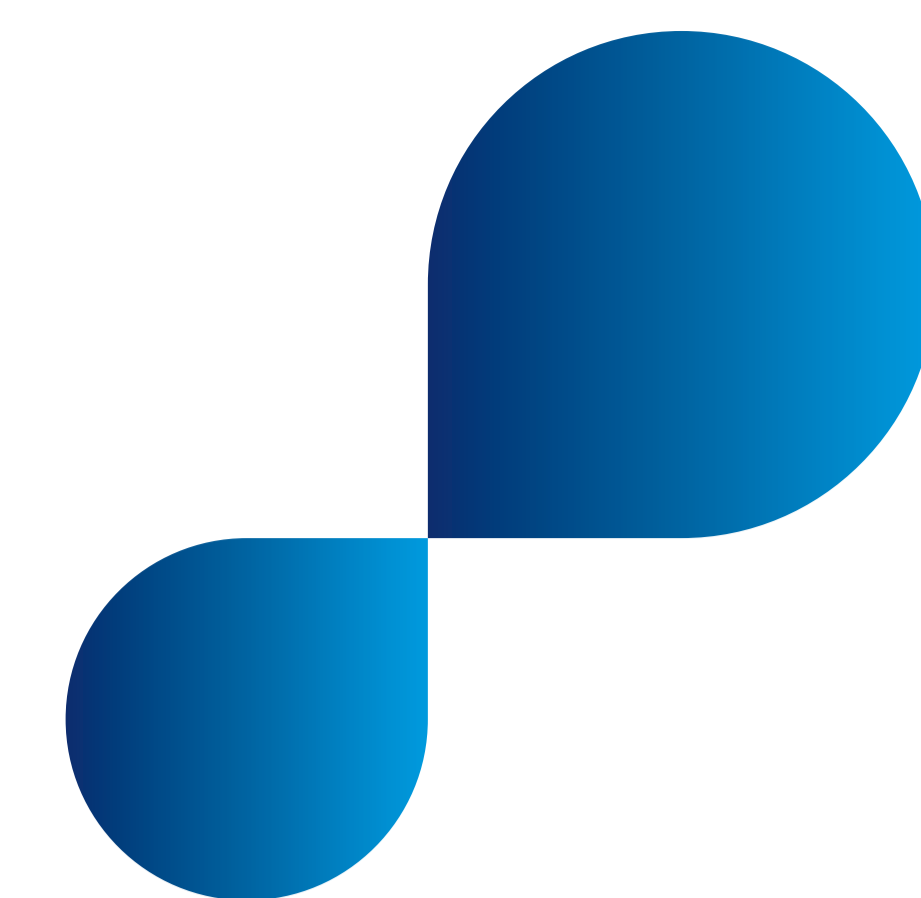


Caracterização e dinâmica de evolução dos diferentes genótipos de circovírus no Brasil ao longo dos anos de 2003 a 2018



Panzardi A¹, Faim L², Hirose F¹, Costa HF², Ravagnani GM¹, Rodrigues CP³, Bordin E⁴, Silva A¹ & Buso MAM¹

¹Departamento Técnico de Saúde Animal (Ourofino Agronegócio), Cravinhos (SP), Brasil. ²Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - PDI (Ourofino Agronegócio), Cravinhos (SP), ³Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil. ⁴Consultor Independente em Biológicos.

Autora para correspondência: andrea.panzardi@ourofino.com

Introdução

O circovírus suíno (PCV) é um vírus DNA fita simples (ssDNA), com maior taxa de substituição quando comparado a demais vírus ssDNA, sendo de $1,2 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos/ano (5). Três tipos de PCV já foram descritos, PCV1 (apatogênico), PCV2 (patogênico) e PCV3 considerado nova variante geneticamente distante relacionada às doenças associadas ao circovírus (PCVAD) (8). Uma alta taxa de substituição faz com que o vírus apresente uma rápida evolução, explicando o surgimento de diferentes genótipos de PCV2 (3). Seis diferentes genótipos foram identificados, sendo o PCV2a, PCV2b e PCV2d os de grande importância para a suinocultura industrial. Uma metanálise recente demonstrou que o PCV2b e PCV2d foram associados a quadros clínicos e lesões mais severas em leitões, mesmo em granjas com vacinação para o genótipo PCV2a (10). Estes genótipos diferem geneticamente e antígenicamente, conferindo maior patogenicidade e possíveis escapes imunológicos (10). O objetivo deste estudo foi o de realizar uma caracterização e dinâmica de evolução de diferentes genótipos de PCV2 circulantes em granjas brasileiras ao longo dos anos de 2003 a 2018.

Materiais e métodos

Um total de 132 amostras de soro e fluido oral de suínos das principais regiões produtoras do país foi utilizado para determinação dos diferentes genótipos de PCV2 circulantes no Brasil ao longo dos anos de 2003 a 2018. Dessas, 81 foram obtidas a partir do banco de dados GenBank (12) e 54 amostras obtidas de animais com sinais clínicos típicos de circovirose, principalmente com quadros de PCVAD. Regiões ORF2 das 81 sequências do GenBank foram selecionadas e traduzidas para a sequência de aminoácidos (aa) utilizando o programa translate do ExPasy. Alinhamentos das sequências foram realizados pelos Softwares ClustalW (13) e Jalview (2). As árvores filogenéticas foram construídas pelo programa Mega7(6). As 54 amostras foram analisadas por qPCR e posterior sequenciamento gênico, sendo que 27/54 foram realizadas na Iowa State University (ISU) pela metodologia de (11) e 24/54 no Instituto de Biotecnologia/UNESP – Botucatu. O DNA das 24 amostras foi extraído com o kit illustraTM blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. Amostras com quantificação superior a 10^2 cópias de DNA/mL foram selecionadas. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando um kit MID de 300 ciclos. Os resultados obtidos foram analisados através do software Geneious R8 (Biomatters, Auckland, New Zealand).

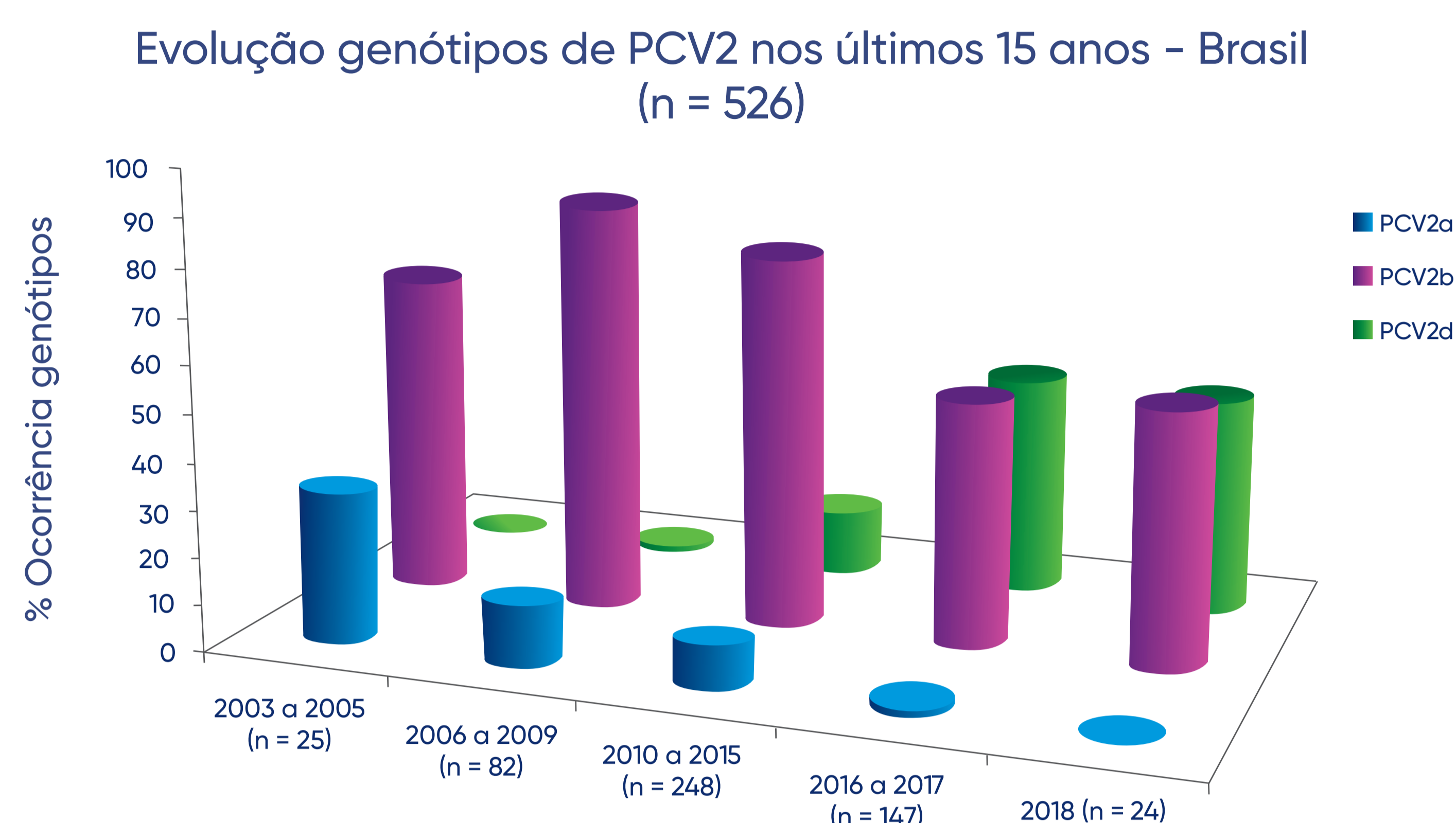
Resultados e Discussão

Das 132 amostras de PCV2 sequenciadas, 8,4% (11/132), 62,1% (82/132) e 29,5% (39/132) representaram os genótipos PCV2a, PCV2b e PCV2d, com predomínio do PCVb seguido pelo PCV2d, denominado antigamente como PCV2b mutante (mPCV2b). O PCV2a em contrapartida apresentou um percentual bem menor em relação aos genótipos b e d, evidenciando uma baixa circulação deste genótipo em granjas brasileiras e comprovando uma evolução do vírus com mutação e substituição viral. Estes resultados corroboram com os apresentados por (7) e (9) os quais caracterizaram de forma muito semelhante uma dinâmica de evolução dos genótipos de PCV2 nos últimos anos, respectivamente nos EUA e Brasil. Das 629 amostras analisadas e sequenciadas por (7) nos últimos seis anos foi verificado o predomínio do PCV2d em 70,5% (456/629), seguido de 12,4% (77/629) de PCV2b, 12,2% (78/629) de PCV2a e 3% (18/629) de PCV2e. (9), nos últimos nove anos verificou que de 398 amostras houve o predomínio do PCV2b em 68,8% (274/398), seguido de 6,3% (25/398) de PCV2a e 24,9% (99/398) de PCV2d.

Esta evolução/mutação pode ser enfatizada quando se compara resultados atuais com os verificados por volta do ano de 2005, onde os genótipos predominantes eram os PCV2a e PCV2b, respectivamente com 73,7% (14/19) e 26,3% (5/19) (1). Isto se torna evidente ao avaliar um estudo recente, em que um total de 11 leitões clinicamente doentes oriundos de oito granjas vacinadas para PCV2a, foram isolados os genótipos em 81,8% (9/11) PCV2b e 8,2% (2/11) PCV2d, apresentando mutações pontuais em três regiões/

epítomos da ORF2, sendo um deles uma região de importância para o reconhecimento de anticorpos, portanto, explicando um possível quadro de falha vacinal (4), demonstrando uma ameaça em potencial para ocorrência de quadros subclínicos e/ou clínicos de circovirose ou PCVAD. O Gráfico abaixo (Gráfico 1) trata-se de um compilado de dados brasileiros, contendo todas amostras de PCV2 sequenciadas e publicadas, demonstrando a dinâmica de evolução constante e muito similar ao ocorrido em outros países.

Gráfico 1. Dinâmica de evolução dos diferentes genótipos de PCV2 no Brasil ao longo dos últimos 15 anos.



Fonte: Adaptado de Castro et al., 2005; GenBank (2003 a 2016), Rodrigues et al., 2018; Gava et al, 2018; dados internos Ourofino (2017 e 2018).

Conclusão

Houve uma nítida mudança na distribuição e circulação de genótipos em granjas brasileiras ao longo dos últimos 15 anos, comprovando uma mutação e evolução do PCV2, sendo os genótipos atualmente predominantes os PCV2b e PCV2d. Portanto, a atualização de vacinas utilizadas para circovirose passa a ser um fator essencial no intuito de reduzir possíveis riscos de falha vacinal e/ou "escape imunológico".

Referências bibliográficas

- (1) Castro, AMMG Caracterização genética de amostras brasileiras de circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Tese de doutorado. p. 32-91. 2005
- (2) Clamp, M.; Cuff, J.; Searle, S. et al. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* v.20. p. 426-427. 2004.
- (3) Franco G. & Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS ONE* 13 (12): e0208585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208585>. 2018.
- (4) Gava, D; Serrão, VHB, Fernandes, L.T. et al. Structure analysis of capsid protein of Porcine Circovirus type 2 from pigs with systemic disease. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 49, p.351-357, 2018.
- (5) Holmes, E.C. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. v.40, p.353-72, 2009.
- (6) Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. p. 1870-1874. 2016.
- (7) Madson, D. PCV2: Future considerations for an evolving virus. *Pig Health Today*. In: <https://pighealthtoday.com/pcv2-future-considerations-for-an-evolving-virus/>. 2018.
- (8) Palinski R.; Piñeyro P.; Shang P. 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 Issue 1, e01879-16, 2017.
- (9) Rodrigues CP, Cruz, TF & Araujo Jr, JP. Temporal variation study of the porcine circovirus species and genotypes prevalences (PCV1, PCV2a, PCV2b, and PCV2d-2) in Brazil from 2009 to 2017.
- (10) Ssemadaali MA, Ilha M & Ramamoorthy S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection na control. *Research in Veterinary Science*. v.103, p.179-186, 2015.
- (11) Xiao CT, Halbur PG & 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, p.1830-1841, 2015.
- (12) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- (13) <http://www.clustal.org/clustal/>.