

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2023.



**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO  
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
DO CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)**

**BRUNA LINDOLFO DA SILVA**

**BOTUCATU - SP  
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO  
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
DO CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)**

**BRUNA LINDOLFO DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu, Unesp, para  
obtenção do título de Mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientador: **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior**

Coorientadoras: **Dra. Caroline Rodrigues Basso**

**Dra. Taís Fukuta da Cruz**

BOTUCATU – SP  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Bruna Lindolfo da.

Padronização de protocolo utilizando partículas magnéticas para extração de DNA do Circovírus suíno (PCV)  
/ Bruna Lindolfo da Silva. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Junior  
Coorientador: Caroline Rodrigues Basso  
Coorientador: Taís Fukuta da Cruz  
Capes: 90400003

1. DNA. 2. Ácidos nucleicos. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Partículas. 5. Circovírus.

Palavras-chave: DNA; Extração de ácido nucleico; PCR quantitativa (qPCR).; PCV; Partículas magnéticas.

## **Dedicatória**

As minhas avós, **Sebastiana Carlota** (In  
memoriam) e **Francisca Timóteo**, pelos  
propósitos que me impulsionaram até aqui. Com  
amor e saudades.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, **Rosalvo** e **Sandra**, pelo imenso apoio e carinho. As minhas irmãs **Renata** e **Natália** e cunhados, **Pitágoras** e **Raphael**, por sempre se fazerem presentes mesmo tão longe (e de outro lado do mundo). Aos meus sobrinhos queridos, **Ana**, **Benjamim** e **Nicolas** pelas constantes mensagens de carinho. O carinho e o apoio de todos foi minha principal motivação!

Aos meus sogros **Mary** e **Francisco**, por serem os principais apoiadores. Ao meu namorado **Cassio**, por todo amor e companheirismo. Agradeço por sempre me incentivarem e apoiarem, em todos os momentos da minha vida. Devo tudo a vocês!

Aos meus amigos: **Bárbara**, **Maria Gabriela**, **Mayra Fernanda**, **Laís Cristina**, **Natália Boracine** e **Murilo**, pelo carinho e incentivo. Por me apoiarem em todos os momentos. Sou imensamente grata por ter vocês!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior** por toda compreensão, pelas oportunidades, incentivo e ensinamentos os quais permitiram a conclusão desse trabalho e de minha evolução profissional. Sou grata por fazer parte do seu grupo de pesquisa!

Às minha co-orientadoras e amigas, **Dra. Caroline Rodrigues Basso** e **Dra. Taís Fukuta da Cruz**, por estarem sempre presentes auxiliando-me em todo o processo experimental desenvolvido nesse trabalho, além da amizade construída. Agradecendo especialmente a **Carol** por todos os momentos descontraídos e de muito aprendizado no Departamento de Química os quais sinto muitas saudades. À **Taís**, pela orientação ter ido além da pós-graduação, com a vivência no LAD-COVID, por todos os momentos divertidos e pelo apoio nos momentos de maior dificuldade.

À **Ana Carolina Yamakawa**, pela amizade e grande colaboração nesse trabalho. Por ter sido sempre presente, com ajuda na seleção de amostras, execução do protocolo e análise por qPCR.

Ao **Prof. Dr. Fábio Sossai Possebon** pela amizade e colaboração em todas as fases deste trabalho, principalmente nas análises estatísticas realizadas. Em especial, por todo apoio e auxílio no LAD-COVID.

À **Dra. Camila Dantas Malossi**, pela amizade e auxílio constante na experimentação desse trabalho. Por ajudar na seleção das amostras, por fornecer os insumos necessários para a realização da qPCR. E também, por todos os momentos vivenciados no LAD-COVID.

À **Profª. Dra. Leila Sabrina Ullmann** pela amizade e colaboração na conclusão desse trabalho. Por todas as contribuições que foram fundamentais para a evolução desse projeto. Além de todo auxílio e companheirismo no LAD-COVID.

Aos meus amigos da Virologia: **Amanda Haisi, Amanda Laurindo, Evelyn Cristine, Jaqueline Assunção, Jéssica Bindo, Larissa Baldo** e do ViriCan: **Bryan Sayed e Felipe Biggi**, por toda amizade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho. Pelos “bolinhos e cafés”, troca de ensinamentos e amizade. Essa trajetória foi muito mais alegre com vocês!

Ao **Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa** pela oportunidade de desenvolver meu primeiro projeto em seu laboratório, por todos os ensinamentos e ajuda. E aos **funcionários** do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Unesp-Botucatu, em especial ao **Cristiano** por toda ajuda com os materiais e companheirismo no LAD-COVID.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** e aos coordenadores do curso.

Ao financiamento concedido pela **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001 e **Fundibio** pela concessão de bolsa.

**E a todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte desse projeto. Meus sinceros agradecimentos!**

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de execução manual do protocolo de extração desenvolvido. ....29
- Figura 2.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtidos por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....37
- Figura 3.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....37
- Figura 4.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....38
- Figura 5.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....38
- Figura 6.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....39
- Figura 7.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....39
- Figura 8.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....40
- Figura 9.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit

comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores $p < 0,05$ indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....	40
<b>Figura 10.</b> Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores $p < 0,05$ indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....	41
<b>Figura 11.</b> Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns .....	41
<b>Figura 12.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns .....	42
<b>Figura 13.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns.....	43
<b>Figura 14.</b> Comparação entre os procedimentos manual e automático sobre a concentração de DNA do PCV obtida por qPCR por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	44
<b>Figura 15.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	45
<b>Figura 16.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de salivas, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	46
<b>Figura 17.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de sangue total, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	47

<b>Figura 18.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de soro, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	48
<b>Figura 19.</b> Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e protocolo de extração desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon.....	49
<b>Figura 20.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e tipo de protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	50
<b>Figura 21.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	51
<b>Figura 22.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ) .....	52
<b>Figura 23.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva .....	52
<b>Figura 24.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	53
<b>Figura 25.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ) .....	54
<b>Figura 26.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total .....	54
<b>Figura 27.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	55
<b>Figura 28.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ).....	56
<b>Figura 29.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro.....	56

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Grupos amostrais.....	27
<b>Quadro 2.</b> Adaptações avaliadas do protocolo desenvolvido ( <i>in house</i> ).....	32
<b>Quadro 3.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de sangue.....	35
<b>Quadro 4.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de soro.....	36
<b>Quadro 5.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de saliva.....	36
<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados para produção do tampão GITC.....	23
<b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados para produção do tampão eluição.....	24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Circovírus suíno (PCV) .....	15
2.2 Metodologias de extração de DNA.....	17
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivos específicos .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Reagentes e Enzima .....	21
4.2 Equipamentos.....	22
4.3 Amostras biológicas.....	22
4.4 Soluções utilizadas no protocolo .....	23
4.4.1 Preparação das partículas magnéticas.....	23
4.4.2 Tampão GITC.....	23
4.4.3 Tampão eluição.....	24
4.5 Delineamento experimental .....	24
4.5.1 Piloto.....	24
4.5.2 Protocolo de extração de DNA do PCV utilizando partículas magnéticas carboxiladas em amostras de sangue total (POSSEBON et al., 2022) .....	24
4.5.3 Modificações do protocolo Possebon et al. (2022) .....	25
4.5.4 Avaliação do volume de partículas magnéticas adequado para extração de DNA do PCV 26	
4.5.5 Avaliação do protocolo proposto em amostras de soro e saliva para extração de DNA do PCV.....	26
4.6 Padronização do protocolo proposto para extração de DNA do PCV .....	26
4.6.1 Extração de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido .....	27
4.6.2 Extração de DNA do PCV utilizando kit EasyPure®Blood Genomic DNA KIT 30	
4.6.3 Extração de DNA do PCV utilizando kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit .....	30
4.7 Otimização do protocolo desenvolvido para extração de DNA do PCV .....	31
4.7.1 Extração automatizada de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido....	31
4.7.2 Avaliação dos parâmetros de lavagem .....	32
4.8 Curva de eficiência .....	32
<b>5. ANÁLISES</b> .....	<b>33</b>
5.1 Detecção e quantificação do PCV por qPCR.....	33

5.2	Análise de pureza e quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria UV-vis	33
5.3	Forma de análises dos resultados .....	33
<b>6.</b>	<b>RESULTADO .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1</b>	<b>Análise do piloto .....</b>	<b>34</b>
<b>6.2</b>	<b>Análise da padronização .....</b>	<b>36</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise da otimização.....</b>	<b>44</b>
<b>6.4</b>	<b>Curva de eficiência .....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## Resumo

O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de exportação de carne suína e para alcançar tais índices zootécnicos, os produtores necessitam do controle de várias doenças emergentes em suínos, sendo a identificação e prevenção fatores essenciais. Dentre as principais doenças, destaca-se a circovirose suína, tendo o circovírus suíno 2 (PCV-2) como agente etiológico. O diagnóstico da circovirose suína se dá por meio dos sinais clínicos associados a testes laboratoriais. A utilização da PCR quantitativa (qPCR) para a determinação da concentração do DNA viral vem sendo considerada o método de escolha neste contexto devido ao alto poder de detecção e na rapidez para obtenção dos resultados. Entretanto, a aplicabilidade desta técnica a torna problemática, devido ao alto custo para a aquisição dos insumos. Um dos principais fatores associados ao elevado custo é a utilização de kits comerciais para extração do ácido nucleico. Grande parte desses insumos são adquiridos pela importação, o que além de refletir no aumento do valor devido a logística, podem ocasionar problemas na produção devido a fatores externos como alta demanda e falta de matéria prima. Com isso, este trabalho teve como objetivo padronizar uma metodologia simples para a extração de DNA, a fim de proporcionar a otimização das análises moleculares para o diagnóstico do PCV em diferentes amostras. O protocolo desenvolvido foi aplicado em amostras de saliva, sangue total e soro de suínos infectados naturalmente. Os produtos das extrações utilizando o protocolo desenvolvido foram submetidas às análises de qPCR para a quantificação do DNA do PCV. Adicionalmente, a análise de integridade do ácido nucleico pela espectrofotometria UV-Vis foi realizada para obtenção dos dados de pureza do material extraído. Dois kits comerciais, um baseado na metodologia de extração por coluna de sílica e o outro por partículas magnéticas, foram utilizados a fim de comparar a eficiência do protocolo proposto. Os protocolos desenvolvidos neste trabalho apresentaram eficiência similar aos kits comerciais para a extração de DNA do PCV para os três tipos de amostras. Todos os protocolos de extração adotados apresentaram baixa pureza em relação às razões 260/280 e 260/230, porém tal fato não interferiu na análise por qPCR. Fatores como simplicidade de execução e possibilidade de automação favorecem a sua utilização.

**Palavras-chaves:** PCV, DNA, extração de ácido nucleico, partículas magnéticas, PCR quantitativa (qPCR).

## Abstract

Brazil occupies the fourth position in the world ranking of pork exports, and to reach such zootechnical indexes, producers need to control several emerging diseases in swine, being the identification and prevention essential factors for this. Among the main diseases, presenting Porcine circovirus 2 (PCV-2) as the etiological agent. The diagnosis of porcine circovirus diseases (PCVD) occurs through clinical signs associated with laboratory tests. The use of quantitative PCR (qPCR) to determine the concentration of viral DNA has been considered the method of choice in this context due to the high power of detection and the speed to obtain the results. However, the applicability of this technique makes it problematic, due to the high cost of acquiring the inputs. One of the main factors associated with the high cost is the use of commercial kits for nucleic acid extraction. Most of these inputs are acquired through imports, which, in addition to reflecting in the increase in value due to logistics, can cause problems in production due to external factors such as high demand and lack of raw material. Thus, this work aimed to standardize a simple methodology for DNA extraction, in order to provide the optimization of molecular analyzes for the diagnosis of PCV in different samples. The developed protocol was applied to saliva, whole blood and serum samples from naturally infected pigs. The products of the extractions using the protocol developed were submitted to qPCR analysis to quantify the PCV DNA. Additionally, nucleic acid integrity analysis by UV-Vis spectrophotometry was performed to obtain data on the purity of the extracted material. Two commercial kits, which used the extraction methodology by silica column and the other by magnetic particles, were used in order to compare the efficiency of the proposed protocol. The protocol developed in this work showed efficiency similar to commercial kits for PCV DNA extraction in serum and saliva samples. All protocols adopted showed low purity in relation to the 260/280 and 260/230 ratios, but this fact did not interfere with the qPCR analysis. Factors such as simplicity of execution and possibility of automation favor its use.

**Keywords:** PCV, DNA, nucleic acid extraction, magnetic particles, quantitative PCR (qPCR).

## 1. INTRODUÇÃO

A circovirose suína é uma das principais enfermidades da suinocultura industrial, sendo responsável pelos maiores prejuízos na criação e exploração de suínos no Brasil e no mundo. Tendo como agente etiológico o circovírus suíno 2 (PCV-2 - “porcine circovirus 2”), disseminado ao redor do mundo e associado a diversas enfermidades denominadas de doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD) ou doenças do circovírus suíno (PCVD).

De forma geral, dentre os animais infectados pelo PCV-2 uma grande parte apresenta infecção subclínica. Na ocorrência de sinais clínicos, a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) é a mais importante manifestação clínica, caracterizada por palidez da pele, dificuldade respiratória, diarreia e icterícia (ocasionalmente), além de imunossupressão decorrente do acometimento de órgãos linfoides. Por ausência de sinais patognomônicos, o diagnóstico das PCVAD mostra-se uma tarefa complexa, principalmente em animais sem manifestação clínica.

Assim, destaca-se a importância do manejo adequado das granjas através da vacinação e monitoramentos dos animais. Com isso, a técnica de PCR quantitativa (qPCR) vem sendo empregada atualmente a fim de acompanhar as granjas de produção industrial. A técnica permite a análise a partir de diversas amostras com alta sensibilidade e valores equivalentes ao alto número de cópias do genoma viral podem sugerir importância na saúde do animal e do plantel, além da identificação de infecção subclínica.

Além da técnica de qPCR para o diagnóstico das PCVAD, a utilização de outras metodologias moleculares como o sequenciamento de DNA é empregada a fim de monitorar e compreender os mecanismos do PCV-2 e sua epidemiologia molecular. E para tais aplicações, a obtenção do material genético do vírus, como também, a metodologia utilizada para sua extração são pontos cruciais. Há um alto custo relacionado com a execução dessas metodologias, em sua maioria, associados aos valores exorbitantes de equipamentos e insumos necessários.

A utilização de kits comerciais para extração de ácido nucleico é um exemplo. A maioria desses insumos são adquiridos através de importação, o que além de refletir no aumento do valor devido à logística, podem ocasionar em problemas em sua produção por conta de fatores externos como alta demanda e falta de matéria prima. Além disso, muitos protocolos comerciais necessitam de equipamentos específicos para sua execução,

como microcentrífugas e homogeneizadores automáticos, que por sua vez acabam aumentando o custo da análise.

Sendo assim, reforça-se a importância do aprimoramento em relação às metodologias de extração de DNA a fim de garantir acessibilidade ao monitoramento e diagnóstico do PCV-2 através da técnica de qPCR em granjas comerciais, objetivando simplicidade, baixo custo, rapidez e qualidade.

## 8. CONCLUSÕES

Os protocolos propostos nesse estudo apresentaram ótimos resultados em relação à extração de DNA do PCV em amostras de saliva, sangue total e soro, quando comparados com os métodos comerciais analisados.

Ambos os protocolos avaliados (Protocolo 1 e Protocolo 9) são aplicáveis para a extração de DNA do PCV nos três tipos de amostras analisadas. A quantificação do PCV pela técnica de qPCR foi realizada com parâmetros eficientes, apesar da presença de contaminantes ou proteínas em ambos os protocolos executados, não interferindo na qualidade analítica da técnica.

Os protocolos desenvolvidos nesse trabalho permitem execução manual e automática, podendo ser realizado conforme a disponibilidade dos recursos disponíveis. O protocolo manual *in house* apresenta vantagem na execução em pequenas amostras.

Os protocolos de extração propostos poderão ser utilizados para extração de DNA de outros vírus.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISCHER, Andrea; BEER, Martin; HOFFMANN, Bernd. Development and validation of rapid magnetic particle based extraction protocols. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2014.

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

ALLAN, G. M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 1998.

BAO, F. et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV 2f. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 432-440, 2018.

BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495-504, 2006.

BIRNBOIM, H. Cv; DOLY, Janine. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic acids research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

CARPI, M. Francesco et al. Human DNA extraction methods: patents and applications. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

CHACON CORTES, Diego Fernando; GRIFFITHS, Lyn. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, v. 2014, n. 2, p. 1-9, 2014.

CUATRECASAS, Pedro; WILCHEK, Meir; ANFINSEN, Christian B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 61, n. 2, p. 636, 1968.

CRUZ, T.F.; KANASHIRO, T.M.; CASTRO, A.M.M.G.; BALDIN, C.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; ARAUJO JUNIOR, J.P. Um ELISA em sanduíche de duplo

anticorpo baseado no circovírus suíno tipo 2 (PCV2) propagado em cultura de células para detecção de anticorpos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.36, p.1171-1177, 2016.

CRUZ, T. F. et al. Diminuição da carga viral do circovirus suíno após vacinação com Circumvent PCV em uma granja comercial. **A Hora Veterinária**, p. 22-26, 2014.

CRUZ, Taís Fukuta. Quantificação do circovírus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões. 2006.

CSEKE, Leland J. et al. (Ed.). **Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine.** CRC press, 2011.

DAIRAWAN, Mariyam; SHETTY, Preetha J. The evolution of DNA extraction methods. **America Journal of Biomedical Science and Research**, v. 8, n. 1, p. 39-46, 2020.

DAVIES, Brendan et al. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. **Virus research**, v. 217, p. 32-37, 2016.

DAVIES, Martin J. et al. Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent. **Analytical biochemistry**, v. 262, n. 1, p. 92-94, 1998.

DOYLE, Jeffrey. DNA protocols for plants. In: **Molecular techniques in taxonomy.** Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 283-293.

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, 2008.

EL-AAL, Abd et al. Comparative study of five methods for DNA extraction from whole blood samples. **International Journal of Health Science**, v. 3, n. 1, 2010.

FERSHI, AR. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. **New York: Freeman WH & Co.**; 1999.

FIRTH, Cadhla et al. Insights sobre a história evolutiva de um patógeno de gado emergente: circovírus suíno 2. **Journal of virology**, v. 83, n. 24, pág. 12813-12821, 2009.

FRANZO, Giovanni et al. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 100, p. 269-280, 2016.

FRANZO, Giovanni 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, 2015.

FRANZO, Giovanni; SEGALÉS, Joaquim. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0208585, 2018.

HARDING, John CS; CLARK, Edward G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production**, v. 5, n. 5, p. 201-203, 1997.

HARMON, Karen M. et al. Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. **Genome announcements**, v. 3, n. 6, p. e01315-15, 2015.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and nonimmunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v.89, p.97-114, 2002.

LIU, Xing et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from China with high homology to PCV2c. **Archives of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1591-1599, 2016.

MARTIN, Hélène; LE POTIER, Marie-Frédérique; MARIS, Pierre. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 3, p. 388-393, 2008.

MATHAY, Conny et al. Method validation for extraction of nucleic acids from peripheral whole blood. **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 6, p. 520-529, 2016.

NAUWYNCK, H. J. et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. **Virus research**, v. 164, n. 1-2, p. 43-45, 2012.

OBERACKER, Phil et al. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. **PLoS biology**, v. 17, n. 1, p. e3000107, 2019.

O'DEA, Mark A. et al. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. **Journal of Virological Methods**, v. 147, n. 1, p. 61-66, 2008.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus research**, v. 286, p. 198044, 2020.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. **The Journal of general virology**, v. 95, n. Pt 11, p. 2495, 2014a.

OPRIESSNIG, Tanja et al. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 US variant mPCV2b strain. **Vaccine**, v. 32, n. 2, p. 230-237, 2014b.

OPRIESSNIG, Tanja 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**, v. 31, n. 3, p. 487-494, 2013.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HABUR, 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, p.591–615, 2007.

PALLARES, F. J. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 515-519, 2002.

PARK, Kee Hwan 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, 2019.

PATTERSON, A. R.; OPRIESSNIG, T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 217-234, 2010.

PSIFIDI, Androniki et al. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. **PloS one**, v. 10, n. 1, p. e0115960, 2015.

POSSEBON, F. S. et al. A fast and cheap in-house magnetic bead RNA extraction method for COVID-19 diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 114414, 2022.

QUY, Dao Van et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.; BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. **Arch Virol.**, v.162, p.1447–1463, 2017.

ROSE, N. et al. A commercial PCV2a-based vaccine significantly reduces PCV2b transmission in experimental conditions. **Vaccine**, v. 34, n. 33, p. 3738-3745, 2016.

ROSE, N.; OPRIESSNIG, T.; GRASLAND, B.; JESTIN, A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus 2 (PCV2). **Virus Research**, v.164, p.78-89, 2012.

ROYER, Ryan L. et al. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n. 6, p. 281-284, 2001.

SAIYED, Z. M.; RAMCHAND, C. N.; TELANG, S. D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, n. 20, p. 204153, 2008.

- SALONEN, Anne et al. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **Journal of microbiological methods**, v. 81, n. 2, p. 127-134, 2010.
- SANT'ANA, D.S. ET AL. Aspectos gerais sobre a Circovirose suína. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 10, Ed. 157, Art. 1059, 2011.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SCIENTIFIC, Thermo. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers Assessment of Nucleic Acid Purity. **Wilmington, DE: Thermo Scientific Nanodrop Products**, 2013.
- SEGALÉS, Joaquim; KEKARAINEN, Tuija; CORTEY, Martí. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease?. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 1-2, p. 13-20, 2013.
- SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v.164, p.10-19, 2012.
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus disease. **Anim. Health Res. Rev** 6, p.119-142, 2005.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, p. 109-124. 2002.
- SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, v.8, n.3, p.133-136, 2000.
- SSEMADAALI, M. A.; ILHA, M.; RAMAMOORTHY, S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. **Research in veterinary science**, v. 103, p. 179-186, 2015.
- STROHMEIER, O. et al. Automated nucleic acid extraction from whole blood, *B. subtilis*, *E. coli*, and Rift Valley fever virus on a centrifugal microfluidic LabDisk. **Rsc Advances**, v. 5, n. 41, p. 32144-32150, 2015.

TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

TISCHER, Ilse et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of virology**, v. 91, n. 3, p. 271-276, 1986.

TISCHER, I. et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, n. 5844, p. 64-66, 1982.

UGELSTAD, John et al. Preparation and biochemical and biomedical applications of new monosized polymer particles. **Polymer international**, v. 30, n. 2, p. 157-168, 1993.

VOGELSTEIN, Bert; GILLESPIE, David. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 2, p. 615-619, 1979.

WITT, Sebastian et al. Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 5, p. 539-547, 2012.

WOODARD, D. L.; HOWARD, A. J.; DOWN, J. A. PROCESS FOR PURIFYING DNA ON HYDRATED SILICA. **L United States patent US**, v. 5342931, 1993.

WOŹNIAK, Aleksandra et al. Real-time PCR detection patterns of porcine circovirus type 2 (PCV2) in polish farms with different statuses of vaccination against PCV2. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1135, 2019.

XIAO, Chao-Ting et al. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the US during 2014–2016. **Veterinary microbiology**, v. 197, p. 72-77, 2016.

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

XIAO, Chao-Ting; HALBUR, Patrick G.; OPRIESSNIG, Tanja. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. **Journal of Virology**, v86, p. 12469, 2012.

ZANELLA, J.R.C. Situação atual da circovirose no Brasil. **Embrapa Suíno e Aves**, p.150-156, 2017.