

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E DA POTÊNCIA DE VACINA
CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS**

**Vitor Barbosa Fialho Martins
Médico Veterinário**

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E DA POTÊNCIA DE VACINA
CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS**

Discente: Vitor Barbosa Fialho Martins

Orientador: Dr. Helio José Montassier

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Veterinárias.**

2022

M386a	Martins, Vitor Barbosa Fialho Avaliação da imunogenicidade e da potência de vacina contra Circovirose Suína (PCV2) em camundongos / Vitor Barbosa Fialho Martins. – Jaboticabal, 2022 72 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Hélio José Montassier 1. Vacina Veterinária. 2. Imunologia Veterinária. 3. Circovirose Suína. 4. Modelo de Camundongos. 5. Camundongo Heterogênico. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E DA POTÊNCIA DE VACINA
CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS

AUTOR: VITOR BARBOSA FIALHO MARTINS

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal


p/ Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Prof. Dr. JOÃO PESSOA ARAUJO JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP


p/ Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de março de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Vitor Barbosa Fialho Martins – nascido em Viçosa, Minas Gerais, em 23 de janeiro de 1987. Iniciou e concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIVIÇOSA (2006-2011). Atuou como aluno de iniciação científica no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores - DVT/UFV (2008-2010). Em 2012 ingressou na Pós-graduação, modalidade “Master of Business Administration” (MBA) em Gestão de Projetos pela Uniderp-Anhanguera (2012-2014). Desde 2011 atua como Médico Veterinário e Pesquisador Clínico em empresas privadas do ramo veterinário (2011-atual), sendo desde 2012 na empresa Ourofino Saúde Animal. Desde 2019 exerce a função de Responsável Técnico em Biotério de Animais de Laboratório (2019-atual) também na Ourofino Saúde Animal. Em 2019 ingressou no programa de mestrado acadêmico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, sob orientação do Prof. Dr. Helio José Montassier.

“Há coisas que são conhecidas
E coisas que são desconhecidas
E entre elas, há portas.”
(William Blake)

Dedico este trabalho à minha
família e à família de todos aqueles
que, de alguma forma, tiveram
suas vidas impactadas pela
pandemia de COVID-19. A ciência
é um sopro de esperança para uma
vida melhor!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria de Lourdes Barbosa Fialho e José Fialho Martins pelo amor, cuidado, apoio incondicional e torcida diária pelo meu sucesso.

Aos meus irmãos, Carol e Rafael pela amizade e pelas palavras de incentivo e ao meu irmão Gabriel (*in memoriam*) por ser fonte eterna de inspiração e saudade.

Aos meus filhos Manuela e Benício por me mostrarem que o amor não era nem de perto aquilo que eu imaginava antes de tê-los. Obrigado por serem meu maior motivo de persistência.

À minha esposa Jéssica, por ter me apoiado a dar mais um passo na caminhada do conhecimento, mesmo com as dificuldades que tivemos que enfrentar e as renúncias por este bem.

Aos meus amigos e colegas de caminhada, principalmente aqueles que deram um pouco de si para que a conclusão do mestrado fosse possível. Amigos do Centro de Pesquisa em Animais de Laboratório, vocês foram sensacionais e não tenho palavras para agradecê-los.

À Vanessa Rizzi, por permitir que, mesmo com os inúmeros compromissos, eu pudesse estar ausente das atividades profissionais para que fosse possível esse sonho. Obrigado também por me incentivar desde quando o ingresso no mestrado era só uma ideia.

Aos parceiros da Ourofino pela ajuda com diversas etapas e necessidades do meu projeto.

À Ourofino Saúde Animal por permitir a condução dos estudos com camundongos e por ceder laboratórios e equipes para análises do projeto.

À Dra. Tais Fukuta da Cruz e ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior por abraçarem meu projeto com ele já em andamento e pelas contribuições científicas.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), por ser o caminho para o meu sonho. Serei sempre grato!

Agradeço por fim, ao meu orientador Prof. Dr. Helio José Montassier por aceitar o desafio e por me conduzir brilhantemente nesta caminhada dura, mas extremamente gratificante. Não poderia ter tido um melhor orientador e parceiro neste projeto. Minha admiração por ti é imensa!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
Palavras-chave: Circovirus, PCV2, PCV2b, PCVAD, vacina, camundongos.....	vi
ABSTRACT	vii
Keywords: Circovirus, PCV2, PCV2b, PCVAD, vaccine, mice.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico do Circovirus Suíno	3
2.2. Síndromes e doenças causadas pelo circovirus suíno	4
2.3. Circovirus suíno Tipo 2 (PCV2) e seus genótipos	6
2.3.1. PCV2b.....	10
2.4. Vacinas utilizadas no controle das doenças causadas por PCV	11
2.5. Camundongos como modelo para estudo de vacinas contra PCV2.....	13
2.6. Imunogenicidade de vacinas contra PCV2 em camundongos	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Modelo animal e local de realização das atividades experimentais.....	18
4.2. Vacinas testadas	18
4.3. Experimento 1 – Avaliação da imunogenicidade de duas vacinas recombinantes contra PCV2 em três diferentes linhagens de camundongos	19
4.3.1. Grupos experimentais e delineamento do Experimento 1.....	19
4.3.2. Ensaio imunoenzimático indireto <i>in house</i> (ELISA indireto <i>in house</i>) para mensuração de anticorpos anti-PCV2 em camundongos do Experimento 1	21
4.3.3. Soroconversão e critérios de título <i>end-point</i> do Experimento 1	22
4.3.4. Análise estatística dos dados do Experimento 1.....	22

4.4. Experimento 2 – Prospecção para o estabelecimento de um teste de potência e avaliação comparativa da proteção conferida pelas vacinas recombinantes contra PCV2 após desafio em camundongos vacinados e não vacinados.	22
4.4.1. Inóculo de Desafio PCV2b	23
4.4.2. Grupos experimentais e delineamento do Experimento 2	23
4.4.3. Ensaio imunoenzimático indireto <i>in house</i> (ELISA indireto <i>in house</i>) para o Experimento 2	25
4.4.4. Critérios de título <i>end-point</i> para o Experimento 2	25
4.4.5. Determinação da Carga Viral por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)..	26
4.4.6. Análise estatística dos dados do Experimento 2	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Resultados do Experimento 1 - Avaliação da imunogenicidade de duas vacinas recombinantes contra PCV2 em três diferentes linhagens de camundongos.....	28
5.1.1. Resposta imune humoral para PCV2 em camundongos vacinados	28
5.1.2. Títulos de anticorpos para PCV2	29
5.2. Resultados do Experimento 2 - Estabelecimento de teste de potência e avaliação comparativa da proteção conferida pelas vacinas recombinantes contra PCV2 após desafio em camundongos.	32
5.2.1. Análise sorológica das amostras por ELISA (ELISA indireto <i>in house</i>).....	32
5.2.2. Determinação da Carga Viral por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	37
6. DISCUSSÃO	38
6.1. Resposta imune humoral para PCV2 em camundongos isogênicos e heterogênicos.....	38
6.2. Desafio de camundongos Swiss com PCV2 e avaliação da carga viral	41
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da imunogenicidade e potência de vacina contra circovirose suína (PCV2) em camundongos**", protocolo nº 007951/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de dezembro de 2019.

Vigência do Projeto	03/02/2020 a 30/08/2020
Espécie / Linhagem	Camundongo (<i>Mus musculus</i>) Swiss, C57BL/6, Balb/C
Nº de animais	144
Peso / Idade	Compatível com a idade (15 a 25g) / 6 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotérios comerciais de criação

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2019.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA



Versão 1.1 jan/2013

**OUROFINO AGRONEGÓCIO LTDA.
OUROFINO SAÚDE ANIMAL LTDA.**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA-OF

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E POTÊNCIA DE VACINA CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS**” protocolo nº **139/2019**, sob a responsabilidade do Sr. (a) Vitor Barbosa Fialho Martins, CPF/MF nº 086.906.226-32 e registro no Conselho de Classe (CRMV) nº SP 32.808 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-OF) em 08 de novembro de 2019.

Dados do projeto:

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Número de animais	144	
Espécie	Camundongo	
raça/linhagem	Swiss, C57BL/6 e Balb/C	
Sexo	Fêmeas	
Peso médio	15 a 25 gramas	
Idade	6 semanas	
Origem	Anilab	
Vigência da autorização	1 ano (fica assim definido pela comissão)	

Eventuais alterações no protocolo devem ser oficializadas através de emenda e submetidas à nova aprovação por esta CEUA.

Um relatório deve ser encaminhado ao final do projeto (para estudos com menos de 06 meses de duração) ou semestralmente (para estudos com mais de 06 meses de duração).

Guataporá, 08 de novembro de 2019.

Flávia Barboza Camargo

Vice-coordenadora da CEUA



Versão 1.1 jan/2013

**OUROFINO AGRONEGÓCIO LTDA.
OUROFINO SAÚDE ANIMAL LTDA.**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA-OF

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E POTÊNCIA DE VACINA CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS - ETAPA 2" protocolo nº 099/2021, sob a responsabilidade do (a) Sr. (a) Vitor Barbosa Fialho Martins, CPF/MF nº 086.906.226-32 e registro no Conselho de Classe (CRMV) nº SP 32.808 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-OF) em 08 de setembro de 2021.

Dados do projeto:

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Número de animais	108	
Espécie	Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	
Raça/linhagem	Swiss	
Sexo	Fêmeas	
Peso médio	11-15g	
Idade	4 semanas	
Origem	Anilab	
Vigência da autorização	3 meses (fica assim definido pela comissão)	

Eventuais alterações no protocolo devem ser oficializadas através de emenda e submetidas à nova aprovação por esta CEUA.

Um relatório deve ser encaminhado ao final do projeto (para estudos com menos de 06 meses de duração) ou semestralmente (para estudos com mais de 06 meses de duração).

Ribeirão Preto, 08 de setembro de 2021.


Vanessa Garcia Rizzi Mussi
Coordenadora da CEUA

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E DA POTÊNCIA DE VACINA CONTRA CIRCOVIROSE SUÍNA (PCV2) EM CAMUNDONGOS

RESUMO – O circovírus suíno Tipo 2 (PCV2) e as doenças associadas a ele (PCVAD) geram grandes perdas para a suinocultura mundial. Além de outras medidas de prevenção para reduzir a disseminação dessa doença infecciosa, a vacinação é um dos meios mais eficientes de se controlar a circovirose nos rebanhos suínos. Há diversos tipos de vacinas comercialmente disponíveis contra o circovírus, sendo que estas devem ser atualizadas com base na evolução que os genótipos prevalentes de PCV2 têm sofrido ao longo dos anos. Assim, o presente estudo propôs a realização de dois experimentos: o primeiro teve o objetivo de comparar a resposta imune humoral anti-PCV2 em camundongos isogênicos e heterogênicos induzidas por vacinas comerciais contra este vírus e o segundo teve o objetivo de se estabelecer um modelo de avaliação da potência de vacinas contra o Circovírus Suíno em camundongos. Para a realização do Experimento 1 foram testadas duas vacinas comerciais contra o PCV2, sendo uma baseada no genótipo “a” e outra no genótipo “b” de PCV2, nas linhagens C57BL/6 e Balb/C e no estoque heterogênico Swiss. Os soros dos animais vacinados foram submetidos à mensuração de anticorpos anti-PCV2 pelo método indireto de ELISA e as médias de DOs obtidas nesse ensaio foram avaliadas e submetidas à análise estatística. Já no Experimento 2, o estoque heterogênico de camundongos Swiss foi escolhido para a realização do delineamento que contou com o mesmo esquema vacinal utilizado no Experimento 1 e foi seguido por desafio com PCV2b em três momentos. Os animais tiveram o sangue colhido e foram então eutanasiados em três momentos para avaliação da resposta imune humoral por ELISA indireto e análise da carga viral de PCV2 em sangue total e tecidos (rim, baço, pulmões e linfonodo). Os resultados demonstraram a capacidade de camundongos isogênicos e heterogênicos vacinados em gerar anticorpos contra PCV2 baseada em soroconversão e títulos end-point avaliados, além de demonstrar não haver diferença estatística ($p = 0,063$) entre os níveis de anticorpos dos grupos testados. Quanto ao modelo de potência, foi possível ratificar os dados obtidos no Experimento 1, com relação à resposta imune humoral e identificar que camundongos Swiss não são capazes de desenvolver sinais clínicos e apresentar viremia e carga viral em pulmões analisados pela técnica de qPCR de acordo com o delineamento utilizado. Apesar disso, conclui-se que camundongos Swiss podem ser utilizados como modelo para avaliação de resposta imune humoral e estudos de potência baseados em perfil sorológico dos animais submetidos à vacinação contra PCV2.

Palavras-chave: Circovírus, PCV2, PCV2b, PCVAD, vacina, camundongos.

EVALUATION OF IMMUNOGENICITY AND VACCINE POTENCY AGAINST PORCINE CIRCOVIROSIS (PCV2) IN MICE

ABSTRACT - Porcine circovirus Type 2 (PCV2) and its associated diseases (PCVAD) generate large losses for a worldwide swine industry. In addition to other preventive measures to reduce the spread of this infectious disease, vaccination is one of the most efficient ways to control circovirus in swine herds. There are several types of vaccines commercially available against circovirus, and a current update is needed because of the evolution that the prevalent PCV2 genotypes have undergone over the years. Thus, the present study proposed the performance of two experiments, the first with the objective of comparing an anti-PCV2 humoral immune response in isogenic and heterogeneous mice induced by commercial vaccines against this virus and the second with the objective of establishing a model for evaluating the potency of vaccines against the Swine Circovirus in a mouse model. To carry out Experiment 1, two commercial vaccines against PCV2 were tested, one based on the “a” genotype and the other on the “b” PCV2 genotype, on the C57BL/6 and Balb/C lines and on the Swiss heterogeneous stock. Sera from vaccinated animals were subjected to measurement of anti-PCV2 antibodies by indirect ELISA method and means of ODs were evaluated and submitted to statistical analysis. In Experiment 2, Swiss mice was chosen to carry out the design that had the same vaccination schedule used in Experiment 1 and was followed by challenge with PCV2b at three times. . The animals had their blood collected and were then euthanized at three times to assess the humoral immune response by indirect ELISA and analysis of the viral load of PCV2 in whole blood and tissues (kidney, spleen, lungs and lymph node). The results demonstrated the ability of isogenic and heterogeneous vaccinated mice to generate antibodies against PCV2 based on seroconversion and evaluated end-point titers, in addition to demonstrating that there was no statistical difference ($p = 0.063$) between the antibody levels of the groups tested. As for the potency model, it was possible to confirm the data obtained in Experiment 1, regarding the humoral immune response and to identify that Swiss mice are not able to develop clinical signs, and present viremia and viral load in the lungs analyzed by qPCR technique according to the design used. Despite this, it is concluded that Swiss mice can be used as a model for evaluating the humoral immune response and potency studies based on the serological profile of the animals submitted to vaccination against PCV2, with a possibility of correlation of the data obtained in this model, when compared to the target species of the vaccine evaluated.

Keywords: Circovirus, PCV2, PCV2b, PCVAD, vaccine, mice.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa genômico representativo de PCV1 e PCV2. PCV1 possui apenas um mapa genômico enquanto PCV2 possui três, sendo o “Mapa 2” (à direita), relacionado ao PCV2b. Adaptado de Zhai et al. (2014).	7
Figura 2. Análise filogenética de PCV2 que representam a heterogeneidade dos oito genótipos de PCV2 (Link et al., 2021).	8
Figura 3. Linhagens e estoques genéticos de camundongos: A – Linhagem Balb/C; B – Linhagem C57BL/6; C – Estoque genético Swiss Webster. Adaptado de Charles River Laboratories (2021). Disponível em: https://www.criver.com/products-services/find-model	14
Figura 4. Dados de absorbância para o estoque genético Swiss em todas as diluições testadas para os grupos GC-S, GV1 e GV4.	30
Figura 5. Dados de absorbância para a linhagem C57BL/6 em todas as diluições testadas para os grupos GC-C, GV2 e GV5.	30
Figura 6. Dados de absorbância para a linhagem BALB/c em todas as diluições testadas para os grupos GC-B, GV3 e GV6.	31
Figura 7. Média de títulos de anticorpos para PCV2 em cada linhagem ou estoque genético e vacinas testadas.	32
Figura 8. Dados de absorbância para os grupos 1, 4 e 7 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D35.	34
Figura 9. Dados de absorbância para os grupos 2, 5 e 8 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D42.	34
Figura 10. Dados de absorbância para os grupos 3, 6 e 9 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D56.	35
Figura 11. Aumento das médias de DO dos grupos vacinados que tiveram amostras colhidas nos momentos D35 (Grupos 1 e 4), D42 (Grupos 2 e 5) e D56 (Grupos 3 e 6).	36
Figura 12. Médias de DOs nos grupos de camundongos não vacinados e desafiados, demonstrando diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo 7 e os grupos 8 e 9.	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Soroconversão para anticorpos anti-PCV2 em camundongos vacinados e controles.....	28
Tabela 2. Média de D.O.s em cada diluição por grupo experimental, <i>cut-offs</i> aplicados e títulos <i>end-point</i> estabelecidos para os grupos vacinados.	29
Tabela 3. Média de D.O.s em cada diluição por grupo experimental, <i>cut-offs</i> aplicados e títulos <i>end-point</i> estabelecidos para os grupos vacinados.	33

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Grupos experimentais, linhagens de camundongos, vacinas testadas, dose, “n” experimental e idade dos animais utilizados para avaliação da imunogenicidade e efeito de linhagem de vacinas recombinantes contra PCV2	20
Quadro 2. Dados dos grupos experimentais, inoculação e número de animais para avaliação da potência de vacinas comerciais contra o PCV2.	24
Quadro 3. Análise estatística por One-way ANOVA dos grupos vacinados <i>versus</i> não vacinados nos momentos D35, D42 e D56.	35
Quadro 4. Análise estatística por One-way ANOVA dos grupos 7, 8 e 9 – não vacinados e desafiados.	36

1. INTRODUÇÃO

O circovirus Tipo 2 (PCV2) é um pequeno vírus não envelopado de DNA circular que, desde a sua descoberta em 1998, é reconhecido como um dos mais importantes patógenos virais que se encontra disseminado amplamente na população suína em todo o mundo (Karuppannan e Opriessnig, 2017; Ouyang et al., 2018).

Os PCVs foram divididos em duas espécies (PCV1 e PCV2) descritas nas décadas de 1970 e 1990, respectivamente. Mais recentemente, duas outras espécies foram identificadas e, atualmente, além de PCV1 e PCV2, PCV3 (2016) e PCV4 (2019) são reconhecidas (Zhai et al., 2019; Opriessnig et al., 2020). Devido à alta variabilidade identificada nos isolados de PCV2, este foi dividido em genótipos com base em um esquema que considera uma ORF2 ou sequências de nucleotídeos do genoma completo, e atualmente o PCV2 é classificado em nove genótipos: PCV2a a PCV2i (Grau-Roma et al., 2008; Segalés et al., 2008; Franzo et al., 2016; Franzo e Segalés, 2018; Wang et al., 2020).

A primeira descrição da doença no Brasil foi realizada em 2000, ocasião em que causou acentuadas perdas econômicas e mortes de suínos na fase de crescimento-terminação. No entanto, a presença de PCV2 no território brasileiro foi confirmada em materiais arquivados desde 1988 (Ciacci-Zanella e Mores, 2003; Ciacci-Zanella et al., 2006). Ademais, é reconhecido que o complexo de Doenças Associadas ao Circovirus Suíno (PCVAD) pode se manifestar clinicamente através de diarreia, perda de peso, pneumonia, doença sistêmica ou falha reprodutiva (Opriessnig et al., 2013a).

A complexidade das doenças ocasionadas pelo circovirus está relacionada à variedade de síndromes clínicas e subclínicas observadas, à característica multifatorial para o surgimento da doença e à multiplicidade de vias de transmissão que facilitam sua disseminação e persistência nas granjas (Franzo et al., 2016).

Além de medidas preventivas para reduzir a disseminação da doença, a vacinação é um dos meios mais eficientes de se controlar a circovirose nos rebanhos suínos. Diversos fatores – incluindo a utilização de vacinas baseadas no genótipo PCV2a – modificaram a circulação desse genótipo e resultaram na

emergência de outros. Dentre estes novos genótipos, o PCV2b foi identificado entre os anos de 2005 e 2006 na América do Norte e, simultaneamente, uma mudança de PCV2a para PCV2b foi identificada em todo o mundo (Opriessnig et al., 2013b).

Deve-se destacar que há diversas vacinas comercialmente disponíveis, sendo a maioria delas baseada no genótipo a (PCV2a) do circovírus. Também foi descrita uma proteção cruzada com outros genótipos de PCV2 (Opriessnig et al., 2017).

Como diversos mecanismos da patogênese e da interação vírus-hospedeiro da circovirose ainda precisam ser mais bem entendidos e vacinas mais eficazes contra os genótipos atualmente circulantes devem ser desenvolvidas, modelos *in vivo* mais acessíveis que elucidem essas questões são necessários (Ouyang et al., 2018). Neste sentido, camundongos têm sido amplamente estudados e utilizados como modelo da infecção pelo circovírus suíno (Opriessnig et al., 2009; Li et al., 2010; Liu et al., 2018; Ouyang et al., 2018). E, dentro desse contexto, destaca-se o uso de camundongos de linhagens isogênicas, como Balb/C e C57BL/6 que são descritos como modelos para estudos envolvendo o PCV2 (Silva Junior, 2005; Aravindaram et al., 2009; Fan et al., 2015; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016; Zhang et al., 2017; Ouyang et al., 2018).

Por outro lado, o uso de camundongos de estoques genéticos heterogênicos tem sido proposto como modelo para o desenvolvimento e teste de vacinas contra diversas doenças infecciosas. Esta alternativa às linhagens isogênicas parte do entendimento de que o repertório imunológico desses indivíduos é mais semelhante à realidade da população-alvo hospedeira na qual a vacina será utilizada, facilitando assim a translação dos resultados obtidos com o modelo de camundongos (Sunagar et al., 2018). No entanto, não há estudos que avaliem comparativamente as respostas imunes de camundongos isogênicos e heterogênicos frente a vacinas contra o PCV2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico do Circovirus Suíno

Em 1974, um grupo de pesquisadores da Alemanha identificou, através de microscopia eletrônica, pequenas partículas esféricas semelhantes a vírus contaminando linhagem de células renais de suínos (PK-15) (Tischer et al., 1974). Posteriormente, o mesmo grupo de trabalho aprofundou as pesquisas e foi possível descrever as partículas como pequenos vírus icosaédricos com diâmetro de 17nm, contendo um genoma de DNA de fita simples, circular, covalentemente fechado e uma proteína principal no capsídeo. Este novo vírus foi classificado na família *Circoviridae* e denominado como “Circovirus Suíno (PCV), uma vez que anticorpos contra ele foram detectados em suínos, mas não encontrados em coelhos, camundongos, bovinos e humanos (Tischer et al., 1982).

Apesar de ter sido encontrado em secreções nasais e fezes de suínos, o vírus foi descrito como não patogênico, pois os animais infectados natural ou artificialmente não apresentavam alterações morfológicas ou sinais clínicos de doença (Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986).

Porém, em 1995, uma nova doença que acometia suínos recém-desmamados – causando seu definhamento e descarte – foi observada no Canadá (Harding, 2004). Em 1998 uma espécie do PCV foi associada a esta síndrome suína, sendo esta denominada como Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) (Allan et al., 1998). Por este motivo, a espécie não patogênica do vírus descoberta nos anos 1970 foi denominada PCV tipo 1 (PCV1) e a espécie patogênica recém descoberta foi identificada como PCV tipo 2 (PCV2) (Meehan et al., 1998; Harding, 2004).

Atualmente, o PCV é dividido em quatro espécies: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4. Apesar de o PCV1 ser considerado não patogênico, os outros três são agentes causais de diversos sinais clínicos e síndromes em suínos. O PCV2, que foi descrito primeiramente como causador da SMDS, hoje é vinculado às Doenças Associadas ao Circovírus Suíno (PCVADs). Em 2015, dois grupos de pesquisadores americanos observaram suínos com Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína

(PDNS), doença cardíaca, falha reprodutiva, doença respiratória, dentre outros sinais clínicos compatíveis com as síndromes ocasionadas por PCV2 e constataram que, histologicamente, as lesões observadas eram semelhantes. Apesar disso, tanto a imunoistoquímica quanto a qPCR apresentaram resultado negativo para esta espécie. Análises posteriores permitiram identificar uma terceira espécie do circovirus e esta foi classificada como PCV3 (Phan et al., 2016; Palinski et al., 2017). Em 2019, um novo PCV emergente foi identificado em amostras de soro de suínos com sinais respiratórios, entéricos e PDNS em Hunan, China (Zhang et al., 2020). Este PCV, classificado como PCV4, é suspeito de estar associado a estes sinais clínicos que também ocorrem em suínos infectados com PCV2 e PCV3 (Palinski et al., 2017). Posteriormente, infecções relacionadas ao PCV4 foram reportadas em outras províncias chinesas e recentemente PCV4 também foi detectado em granjas coreanas (Nguyen et al., 2021).

Desde a sua descoberta, PCV2 tem sido descrito como um dos mais importantes patógenos virais que acometem e causam perdas à suinocultura mundial (Karuppannan e Opriessnig, 2017). Ademais, as espécies PCV3 e PCV4 parecem ter papel crescente nos problemas relacionados às infecções por PCVs na atividade suinícola mundial e mais estudos são necessários para que seja possível uma avaliação dos impactos econômicos e de suas implicações para um controle mais efetivo das doenças emergentes associadas a essas novas espécies (Opriessnig et al., 2020).

2.2. Síndromes e doenças causadas pelo circovirus suíno

As doenças associadas ao PCV têm sido descritas em detalhes desde o relato do conjunto de sinais clínicos conhecidos como Síndrome Multissistêmica do Definhamento Suíno (SMDS), observada inicialmente em casos ocorridos no Canadá em 1991 (Harding, 1996). Os suínos acometidos apresentam, geralmente, aumento no tamanho dos linfonodos, redução no ganho de peso ou descarte, combinado com muitos outros sinais inespecíficos como dispneia, diarreia, palidez e icterícia (Sorden, 2000; Segalés e Domingo, 2002). Outros sinais da SMDS incluem

tosse, febre, sinais de afecções no sistema nervoso central e morte súbita (Harding e Clark, 1997).

O termo SMDS foi introduzido em 1996 (Clark, 1996; Harding, 1996), mas diversas propostas de alteração da nomenclatura foram elaboradas, uma vez que não somente suínos após o desmame são acometidos, mas o PCV também pode ser detectado em animais mais velhos, ou mesmo em recém-nascidos. Além disso, muitos outros sinais clínicos e síndromes foram descritos associados à infecção por PCV2. Complexo das doenças respiratórias suínas, falhas reprodutivas, enterite granulomatosa, linfadenite necrosante, epidermite exsudativa e tremor congênito são outras formas de apresentação da doença causada por PCV, amplamente disseminadas nas granjas suínas (Finsterbusch; Mankertz, 2009; Segalés, 2012; Ren et al., 2016).

Por esses motivos, o termo “doenças sistêmicas associadas ao circovirus (PCVAD)” surgiu como uma denominação mais adequada, passando a ser adotada em 2006 pela American Association of Swine Veterinarians (AASV) (Gillespie et al., 2009) e utilizada nos mais diversos trabalhos publicados a respeito das doenças e síndromes ocasionadas por PCV2 (Park et al., 2013; Ssemadaali et al., 2015; Liu et al., 2018).

A síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) também é descrita tendo como possível etiologia o PCV2, sendo considerada uma PCVAD devido à relação entre a doença clínica e a detecção do PCV2. Apesar disso, há controvérsias quanto à relação direta entre PCV2 e PDNS, uma vez que essa associação ainda é circunstancial e a detecção do vírus não é considerada na definição do seu diagnóstico, pois mesmo na ausência de PCV2, PDNS já foi reproduzida experimentalmente, frente ao desafio com outros agentes, de forma que o papel etiológico do PCV2 na PDNS ainda precisa de mais estudos e entendimentos (Krakowka et al., 2008; Segalés, 2012).

Clinicamente, a PDNS é distinta, com máculas e pápulas aparentemente bem demarcadas de vermelho a escuro. Os rins são frequentemente aumentados e pálidos e apresentam petéquias corticais. Histologicamente, a PDNS é caracterizada por vasculite necrosante sistêmica juntamente com glomerulite e nefrite intersticial. Acredita-se que a patogênese dessa vasculite sistêmica, bem como da

glomerulonefrite fibrinosa, seja mediada por imunocomplexos (Smith et al., 1993; Drolet et al., 1999; Segalés, 2012).

É fato que o PCV2 possui como alvo primário os tecidos linfóides, o que gera a depleção deste sistema e a imunossupressão dos suínos acometidos. A doença é exacerbada por imunoestimulação ou infecções concomitantes com outros patógenos (Meng, 2013). Por este motivo, além das diversas manifestações relacionadas à infecção pelo circovirus suíno, muitas das síndromes associadas à PCVAD são resultado da co-infecção do PCV2 e outros patógenos suínos, tais como vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRSV), Parvovírus Suíno (PPV), *Mycoplasma hyopneumoniae* e vírus da Influenza Suína (SIV) (Gillespie et al., 2009; Meng, 2013; Ren et al., 2016).

2.3. Circovirus suíno Tipo 2 (PCV2) e seus genótipos

O PCV2 pertence à família Circoviridae e contém um DNA circular de fita única de 1,7 kb (Figura 1) (Finsterbusch; Mankertz, 2009; Ren et al., 2016). Apesar de ser um vírus de DNA, a arquitetura do genoma de PCV2 é simples e entre as onze regiões abertas de leitura (ORFs) encontradas, apenas ORF1 e ORF2, que codificam para as proteínas replicase (*Rep*) e capsidial (*Cap*), respectivamente, são indispensáveis para a propagação do vírus (Hamel et al., 1998; Mankertz et al., 1998; Lv et al., 2014).

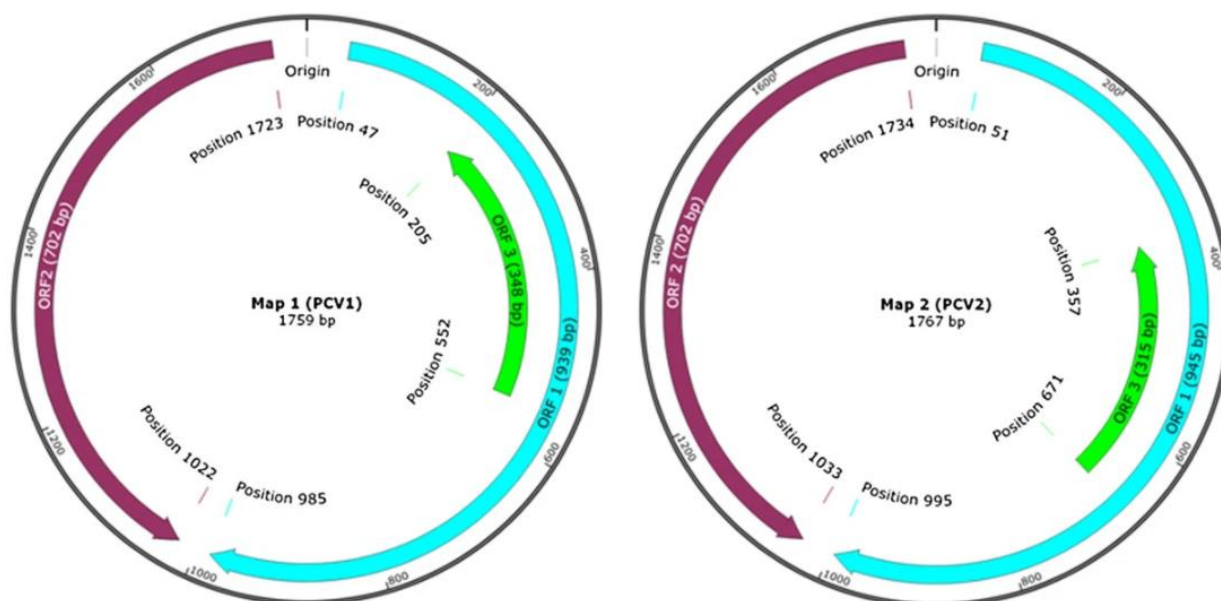


Figura 1. Mapa genômico representativo de PCV1 e PCV2. PCV1 possui apenas um mapa genômico enquanto PCV2 possui três, sendo o “Mapa 2” (à direita), relacionado ao PCV2b. Adaptado de Zhai et al. (2014).

Das ORFs reconhecidas, a mais estudada e amplamente sequenciada é a ORF2, que codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo viral (*Cap*) (Gao et al., 2013; Lv et al., 2014; Lv et al., 2015). Esta proteína representa o único componente do capsídeo viral e sua síntese ocorre após a infecção viral, sendo também o principal alvo da resposta imune deste organismo e contendo tanto epítomos envolvidos na interação com anticorpos vírus-neutralizantes como epítomos de células T (Cheung, 2003; Khayat et al., 2011; Franzo et al., 2016).

O PCV2 é reconhecido por sua taxa evolutiva estimada de 1.4×10^{-3} a 7.8×10^{-4} substituições/sítio/ano, que é a mais alta entre os comparáveis vírus de DNA (Firth et al., 2009; Xiao et al., 2015; Franzo et al., 2016). Essa alta taxa evolutiva resultou em um grande número de diferentes *clusters* de PCV2 a campo, sugerindo diversas formas de identificação e classificação do PCV2.

Análises filogenéticas demonstraram uma similaridade muito grande – maior que 93% nas sequências nucleotídicas entre os PCVs identificados em todo o mundo (Olvera et al., 2007). Contudo, quando foi aplicado um ponto de corte de

Em trabalhos posteriores identificou-se que PCV2 poderia ser classificado em cinco diferentes genótipos, incluindo PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d e PCV2e, dos quais PCV2a é o primeiro descrito (Opriessnig et al. 2017). Porém, diante da alta variabilidade dos genótipos, uma nova forma de classificação mais robusta, baseada em três requisitos foi proposta, o que resultou na identificação atual de oito genótipos (*a* ao *h*) (Figura 2). E, além disso, Wang e Colaboradores (2020) sugerem ainda um nono genótipo PCV2i de acordo com diferenças encontradas em clusters analisados frente àqueles existentes nos genótipos já identificados.

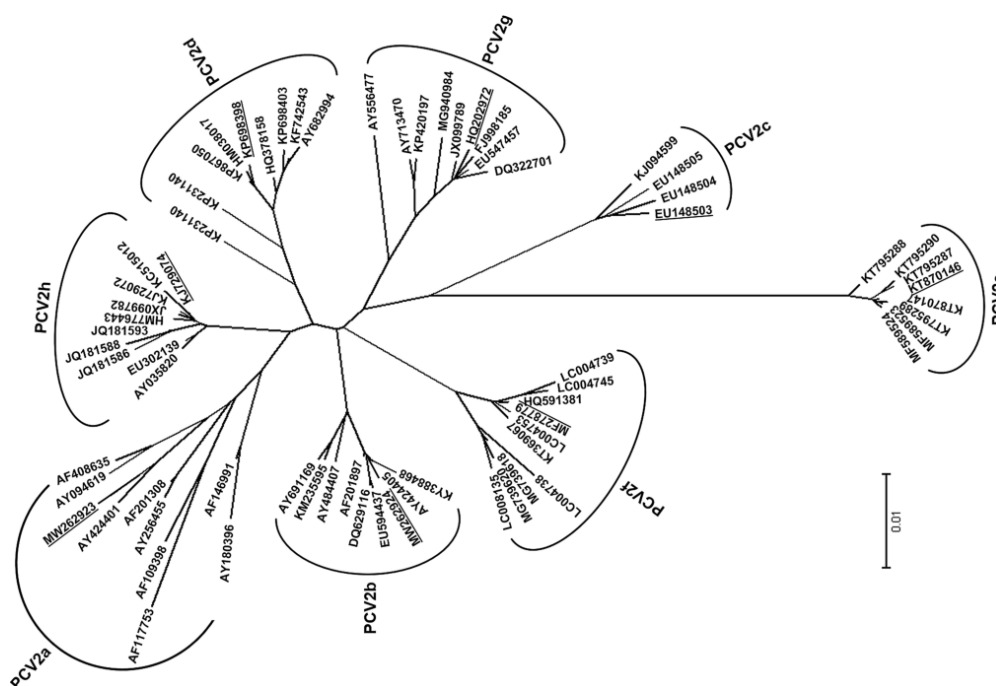


Figura 2. Análise filogenética de PCV2 que representam a heterogeneidade dos oito genótipos de PCV2 (Link et al., 2021).

Desde a sua descoberta, duas grandes alterações na prevalência de genótipos circulantes de PCV2 foram observadas, as quais são descritas como “mudanças genotípicas” (Franzo et al., 2016). O genótipo PCV2a, mais prevalente nos anos iniciais, foi sobrepujado pelo genótipo PCV2b em meados dos anos 2000, com um suposto aumento na virulência (Carman et al., 2006; Carman et al., 2008; Beach; Meng, 2012; Constans et al., 2015; Franzo et al., 2016). Neste período, PCV2a e PCV2b foram reconhecidos como os principais genótipos circulantes, com altas prevalências conforme descrito anteriormente (Segalés et al., 2013).

Nos últimos anos, o genótipo PCV2d (anteriormente conhecido como mutante PCV2b) tem aumentado sua prevalência nas principais áreas produtoras de suínos (Guo et al., 2010; Xiao et al., 2015; Franzo et al., 2016; Kwon et al., 2017) e parece estar se disseminando cada vez mais globalmente (Franzo e Segalés, 2018).

Um fato relevante sobre a prevalência dos genótipos de PCV2 é que a primeira mudança de genótipo ocorreu previamente à ampla vacinação contra o vírus, enquanto a recente mudança genotípica foi detectada na presença de vacinação generalizada, demonstrando que, além de aspectos naturais, a ampla vacinação pode ter influenciado a evolução de genótipos do PCV2, de forma a exercer pressão seletiva diferencial entre estes, afetando a epidemiologia e evolução desse vírus (Franzo et al., 2016).

Apesar da grande variabilidade de *clusters* e genótipos identificados, bem como da importância do estudo de sua filogenia, também se faz necessário avaliar os impactos práticos que os diferentes genótipos ocasionam no desenvolvimento de sinais clínicos e da proteção conferida pelas vacinas nos suínos, auxiliando na tomada de decisão com relação à necessidade de atualização das vacinas frente aos genótipos emergentes (Franzo e Segalés, 2020).

Além disso, há respaldo científico para demonstrar que, em algumas situações, o estudo da presença de determinados epítomos de interesse para resposta àquele agente, podem ter papel principal no sucesso obtido quanto à proteção vacinal, quando comparado à escolha baseada somente no estudo filogenético (Franzo e Segalés, 2020).

2.3.1. PCV2b

Até o início dos anos 2000, o genótipo PCV2a era o mais prevalente e consistia no principal foco dos principais estudos realizados com a circovirose suína. No entanto, em 2003 ocorreu uma grande mudança de genótipo de PCV2a para PCV2b. As epidemias graves de PCV2 ligadas à introdução de PCV2b ocorreram na América do Norte durante 2005/2006 e posteriormente levaram à introdução e uso em grande escala de vacinas PCV2 em suínos (Opriessnig et al., 2017). Todavia, o PCV2b emergiu globalmente, sendo associado a surtos mais severos de circovirose, tornando-se o genótipo prevalente em suínos no mundo inteiro (Ciacchi-Zanella et al., 2015). As variações de sequência de nucleotídeos entre PCV2a e PCV2b são encontradas principalmente no gene do capsídeo, incluindo um “motif” distinto do domínio de enzima iniciadora (Cheung et al., 2007, Olvera et al., 2007).

Como as principais vacinas disponíveis comercialmente são formuladas com o genótipo PCV2a e o genótipo PCV2b está mais amplamente disseminado que o primeiro, buscou-se demonstrar a eficácia das vacinas comerciais frente à esse novo genótipo do PCV2 (Beach et al., 2010; Opriessnig et al., 2017; Chae, 2012; Jeong et al., 2015; Rose et al., 2016).

Além disso e apesar de ter sido possível identificar uma proteção cruzada com vacinas formuladas com o PCV2a, são relatados desempenhos superiores de vacinas homólogas ao genótipo de desafio do PCV2, comparadas às vacinas heterólogas, o que reforçou a necessidade de que novas vacinas específicas contra PCV2b fossem desenvolvidas e testadas (Guo et al., 2012; Opriessnig et al., 2013a; Seo et al., 2014).

Em trabalho recente demonstrou-se que vacinas baseadas nos genótipos “a” e “b” do PCV2 são capazes de reduzir a viremia e as alterações patológicas em suínos desafiados com PCV2d (Opriessnig et al., 2020), o que se se mostra de grande importância enquanto não há vacinas baseadas no genótipo PCV2d.

2.4. Vacinas utilizadas no controle das doenças causadas por PCV

Para o controle da circovirose, é importante a implementação de medidas de biossegurança nas granjas de suínos, a manutenção do equilíbrio imunológico dos rebanhos e a manutenção de baixa carga microbiana (viral) (Ciacchi-Zanella, 2017). No entanto, a vacinação é considerada um método eficaz, econômico e tem sido a principal ferramenta utilizada na maioria das áreas produtoras de suínos como medida para controle da doença (Segalés, 2015; Liu et al., 2018).

A primeira vacina comercial surgiu em 2004 na Europa e em 2006 na América do Norte e, desde então, tem sido boa a sua aceitação pelos suinocultores em todo o mundo, sendo atualmente o agente profilático mais utilizado em criações de suínos (Karuppannan e Opriessnig, 2017).

As vacinas inativadas, como a Circovac[®], da Merial e a Foster[®] PCV da Pfizer (atualmente Zoetis) foram as pioneiras, enquanto posteriormente as vacinas recombinantes como a Porcilis[®] PCV e Circumvent[®] PCV (MSD Saúde Animal), Ingelvac[®] CircoFLEX (Boehringer Ingelheim) (Afghah et al., 2017), Pro-vac[®] Circomaster (Dechra), Safesui Circovirus (Ourofino Saúde Animal) dentre outras, surgiram – com comercialização inclusive no Brasil – como complemento ao mercado de vacinas contra o PCV2.

Atualmente estão disponíveis comercialmente em diversos países e também no Brasil, vacinas baseadas no genótipo *a*, no genótipo *b* do PCV2 (Afghah et al., 2017) e, mais recentemente, foi introduzida uma vacina baseada em ambos os genótipos (*a* e *b*), sendo uma tendência que as vacinas para PCV2 também possuam antígeno para *Mycoplasma hyopneumoniae* em sua composição. Tais vacinas são reconhecidas pelo seu grande sucesso em reduzir as perdas ocasionadas pela doença em comparação ao período anterior à sua introdução e o seu uso rotineiro nas criações de suínos. As vacinas disponíveis são eficientes na indução de respostas imunes humoral e mediada por células contra o PCV2 (Fort et al., 2009; Kekarainen et al., 2010; Fort et al., 2012).

As principais vacinas comerciais disponíveis, incluindo as utilizadas no presente trabalho são produzidas a partir de ORF2, de forma recombinante. O antígeno produzido neste tipo de vacina é obtido por meio de um Sistema de Expressão de Baculovírus (BEVS) (Kim e Hahn, 2021) em células de inseto. O baculovírus é modificado pela inserção do gene ORF2 que codifica a proteína da cápside de PCV2, a ORF2. O antígeno ORF2 é secretado em meio de produção apropriado e a reação é interrompida pela inativação do Baculovírus. Já a vacina comercial que apresenta os antígenos para PCV2a e PCV2b é do tipo quimérica e, de acordo com informações do fabricante, é produzida a partir do vírus completo.

Com base em diversos estudos experimentais e a campo, foi possível demonstrar que a vacinação contra PCV2 é comprovadamente um método capaz de reduzir a infecção, a viremia e as lesões relacionadas ao PCV2, além de incrementar o ganho de peso diário em comparação a animais não vacinados (Segalés, 2015). A redução na morbidade e o incremento na eficiência produtiva após a adoção de vacinas contra PCV2 demonstram, não só a importância dessas vacinas, como enfatizam os danos que o PCV2 pode provocar sobre a saúde dos suínos (Ellis, 2014).

Apesar de os estudos terem demonstrado um certo grau de imuno-proteção cruzada heteróloga das vacinas formuladas com o PCV2a contra os outros genótipos desse vírus, outros trabalhos demonstraram uma superioridade das vacinas homólogas ao genótipo de desafio em comparação às vacinas heterólogas (Beach et al., 2010; Opriessnig et al., 2013a; Opriessnig et al., 2014; Li et al., 2017), indicando a necessidade de atualização das vacinas disponíveis de acordo com os genótipos emergentes e mais prevalentes em uma dada região ou país (Ciacci-Zanella, 2017).

O alcance da imunidade esterilizante com uso das vacinas comerciais é difícil e tem sido citado com um dos motivos para a rápida evolução dos genótipos de PCV2 (Franzo et al., 2016; Karuppannan e Opriessnig, 2017). Apesar disso, a contribuição das vacinas atuais tem ocorrido inclusive com proteção heteróloga, com estudos demonstrando que vacinas baseadas nos genótipos *a* ou *b* geram imunoproteção contra a patogênese de outros genótipos de PCV2, incluindo PCV2d (Opriessnig et al., 2017).

Por fim, devido à baixa identidade genética e em nível de aminoácidos entre a ORF2 de PCV2 e as ORF2 de PCV3 e PCV4, não é esperada uma imunoproteção cruzada entre vacinação com vacinas para PCV2 frente a outros PCVs (Klaumann et al., 2018), o que indica a necessidade de estudos nesta direção, pois futuramente vacinas contra PCV3 e PCV4 podem se tornar necessárias.

2.5. Camundongos como modelo para estudo de vacinas contra PCV2

Modelos de camundongo são usados para fins específicos no processo de desenvolvimento de uma vacina, bem como para estudos de potência que objetivam a liberação de lotes comerciais do produto após seu registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Craveiro, 2008). Além disso, os camundongos podem ser úteis para se obter um maior conhecimento a respeito de um candidato vacinal, antes que este seja testado na espécie alvo (Zhang et. al., 2015; Zhu et. al., 2016).

Apesar de ter sido demonstrado que camundongos não se constituem em um modelo eficiente para elucidar a imunopatogênese de PCV2, pois, via de regra, não apresentaram doença e lesões semelhantes às observadas após a infecção de suínos com esse vírus (Opriessnig et al., 2009), estes animais têm sido amplamente utilizados como modelo para estudos envolvendo o PCV2, dentre eles a avaliação da imunogenicidade de vacinas e candidatos vacinais contra esse vírus (Kiupel et al., 2001; Li et al., 2010; Sylla et al., 2014; Liu et al., 2018; Ouyang et al., 2018).

Dentre as linhagens e estoques genéticos de camundongos (*outbred stocks*) disponíveis (Figura 3), camundongos BALB/c são os mais utilizados para estudo do PCV2 (Silva Junior, 2005; Aravindaram et al., 2009; Fan et al., 2015; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016; Ouyang et al., 2018). No entanto, camundongos C57BL/6 têm sido utilizados em inúmeros experimentos envolvendo respostas imunes e avaliação de vacinas, sendo, inclusive, modelo para vacinas contra PCV2 (Zhang et al., 2017).

Como se sabe que, mesmo entre as linhagens isogênicas de camundongo, existem variações quanto ao perfil de respostas imunes obtidas (Sellers et al., 2012), faz-se necessário identificar o modelo mais adequado para a avaliação de uma vacina contra PCV2.

Além das linhagens isogênicas, tem sido proposta a utilização de camundongos de estoques genéticos heterogênicos como modelos para desenvolvimento e teste de vacinas contra diversas doenças, partindo-se do pressuposto que o repertório imunológico das linhagens isogênicas é mais restrito que o observado nos animais heterogênicos, além de camundongos heterogênicos possuírem uma diversidade imunológica superior, o que se assemelha mais à realidade da população na qual a vacina será utilizada (Sunagar et al., 2018).



Figura 3. Linhagens e estoques genéticos de camundongos: A – Linhagem Balb/C; B – Linhagem C57BL/6; C – Estoque genético Swiss Webster. Adaptado de Charles River Laboratories (2021). Disponível em: <https://www.criver.com/products-services/find-model>.

Ratificando a importância de camundongos heterogênicos como modelo para pesquisas biomédicas, Tuttle e Colaboradores (2018) não encontraram em seu trabalho a evidência de maior estabilidade de características em animais isogênicos em comparação aos heterogênicos, conforme conhecimento previamente difundido. Segundo os mesmos autores, exceto em casos em que há um modelo de doença estabelecido e conhecido, a utilização de camundongos heterogênicos pode tornar os resultados mais generalizáveis em diferentes condições e populações, evitando inclusive falhas na reprodutibilidade experimental.

2.6. Imunogenicidade de vacinas contra PCV2 em camundongos

Dadas as perdas ocasionadas pelo PCV2 na suinocultura, diversas vacinas estão disponíveis comercialmente, mas ainda há a necessidade de estudos com foco em se desenvolver e testar novas preparações vacinais, sendo estas urgentes e relevantes para as infecções ocasionadas pelo Circovirus Suíno (Liu et al., 2018).

Quanto ao uso de camundongos para esta finalidade, diversos estudos têm demonstrado a capacidade desta espécie em gerar respostas imunes humoral e celular contra PCV2, sendo um modelo adequado para avaliação da imunogenicidade de vacinas contra o circovirus suíno (Wang et al., 2006; Liu et al., 2018; Jung et al., 2019). Em adição a isto, foi comprovada a capacidade de camundongos em ativar a resposta imune inata, produzir altos níveis de anticorpos neutralizantes, elevados níveis de IgG, ativação da resposta mediada por células **T**, redução nas alterações histopatológicas de órgãos afetados, redução na viremia, além de incremento na produção de citocinas após imunizações de diversos preparados vacinais que utilizaram PCV2 como base (Ouyang et al., 2018).

Aguilera e colaboradores (2017) demonstraram a capacidade de camundongos BALB/c em gerar altos níveis de anticorpos do isótipo IgG após esquema de vacinação realizada com preparados vacinais quiméricos contendo Partículas Semelhantes a Vírus (Vírus-Like Particles – VLPs) construídas a partir do próprio capsídeo de PCV2.

Em outro estudo – no qual camundongos BALB/c foram imunizados com PCV2 inativados e com proteínas purificadas do vírus – foi demonstrada a produção de altos níveis de anticorpos específicos para PCV2 após quatro imunizações. Além disso, comprovou-se a produção de anticorpos neutralizantes contra esse vírus e a proteção dos animais vacinados em comparação ao grupo inoculado somente com PBS, após desafio com PCV2 (Liu et al., 2018).

Além desses, há outros estudos que utilizaram linhagens isogênicas de camundongos como modelo para elucidar questões relacionadas à imunogenicidade e resposta imune frente a preparados vacinais contra PCV2 sob diversos aspectos, obtendo respostas satisfatórias frente às hipóteses testadas (Guo et al., 2015; Zhang et al., 2015; Ouyang et al., 2018).

O sucesso demonstrado na utilização de camundongos para o esclarecimento de hipóteses envolvendo vacinas contra PCV2, associado ao menor custo quando comparado à utilização da espécie alvo para estudos dessa natureza, além da importância de camundongos como parte dos testes exigidos para comprovar a potência de vacinas comerciais, fundamentam a necessidade de estudos adicionais com uso deste modelo experimental para avaliação de vacinas contra o PCV2.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunogenicidade e a potência de vacinas contra o Circovirus Suíno PCV2 em modelo de camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta imune humoral gerada após imunização com duas vacinas recombinantes, sendo uma delas baseada no genótipo PCV2a e outra baseada em PCV2b, em modelo de camundongos;
- Avaliar se há efeito da linhagem ou do estoque genético de camundongos utilizados sobre a resposta imune humoral gerada com ambas as vacinas testadas;
- Avaliar se há diferença na proteção de camundongos imunizados com as vacinas baseadas em PCV2a e PCV2b, após desafio com o genótipo *b* do circovirus suíno (PCV2b), com base na mensuração da carga viral nos animais dos diferentes grupos experimentais;
- Estabelecer uma metodologia para os estudos de potência, necessários tanto para o desenvolvimento quanto para o controle de qualidade de vacinas recombinantes contra PCV2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo animal e local de realização das atividades experimentais

Foram utilizados camundongos das linhagens isogênicas Balb/C e C57BL/6, fêmeas, de padrão sanitário SPF (Specific Patogen Free), com idade de 6 semanas na data da primeira vacinação. Também foram utilizados camundongos de estoque genético (*Outbred Stock*) Swiss, fêmeas, de padrão sanitário convencional, com idade de 6 semanas (Experimento 1) e 4 semanas (Experimento 2) na data da primeira vacinação.

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa em Animais de Laboratório da Ourofino Saúde Animal, localizado em Guataporã-SP. Os animais permaneceram alojados em sistema *Intra Ventilated Cage* (IVC) dotado de mini-isoladores, com condições de alojamento, sanidade, alimentação, hidratação e manejo de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do biotério. As colheitas e processamento de amostras também foram realizados na mesma instalação, assim como o preparo dos inóculos de desafio.

As atividades de detecção de anticorpos anti-PCV2 por técnica sorológica foram realizadas em um laboratório situado na sede da Ourofino Saúde Animal, localizada em Cravinhos-SP, enquanto a análise molecular da carga viral após desafio com PCV2 foi realizada no Instituto de Biotecnologia – IBTEC, pertencente à UNESP de Botucatu-SP.

4.2. Vacinas testadas

Foram testadas duas vacinas recombinantes comercialmente disponíveis, sendo uma delas baseada na proteína do capsídeo codificada pelo gene ORF2 de PCV2a e expressa em baculovirus e outra, construída de forma semelhante, mas a partir do genótipo PCV2b.

O critério de escolha das vacinas se baseou na relevância destas para o mercado nacional, no fato de possuírem registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, na semelhança quanto à forma de produção e composição, além de serem compostas somente por antígenos monovalentes de PCV2. Por estes motivos, escolheu-se para estudo do modelo as vacinas Ingelvac® CircoFLEX (Boehringer Ingelheim) que é baseada no genótipo **a** e a Safesui® Circovirus (Ourofino Saúde Animal), baseada no genótipo **b**.

4.3. Experimento 1 – Avaliação da imunogenicidade de duas vacinas recombinantes contra PCV2 em três diferentes linhagens de camundongos

4.3.1. Grupos experimentais e delineamento do Experimento 1

Para a realização do Experimento 1, 108 camundongos fêmeas, de 6 semanas de idade, dos quais 36 do estoque genético Swiss, 36 da linhagem C57BL/6 e 36 da linhagem Balb/C foram selecionados, randomizados e aclimatados em gaiolas estéreis em uma instalação NBA-2. Camundongos Swiss apresentavam padrão sanitário convencional, enquanto C57BL/6 e Balb/C eram livres de patógenos específicos (SPF). Os animais foram obtidos de fornecedores credenciados e sua utilização foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-OF, sob o protocolo número 139/2019.

Os animais foram divididos em 9 grupos de 12 animais cada, sendo os grupos 1, 2 e 3 constituídos por camundongos Swiss, C57BL/6 e Balb/C, respectivamente, os quais foram imunizados com a vacina baseada em PCV2a (grupos GV1, GV2 e GV3); enquanto os grupos 4, 5 e 6 compostos pelos animais Swiss, C57BL/6 e Balb/c, respectivamente, foram imunizados com a vacina baseada em PCV2b (grupos GV4, GV5 e GV6); e os grupos 7, 8 e 9, compostos por Swiss, C57BL/6 e Balb/C, foram mantidos como controles negativos de cada estoque genético ou linhagem e inoculados com água para injeção (grupos GC-S, GC-C e GC-B), de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. Grupos experimentais, linhagens de camundongos, vacinas testadas, dose, “n” experimental e idade dos animais utilizados para avaliação da imunogenicidade e efeito de linhagem de vacinas recombinantes contra PCV2.

GRUPO	LINHAGEM DE CAMUNDONGO	INÓCULO	DOSE*	“n” EXPERIMENTAL/ IDADE
GV1	Swiss	Vacina recombinante 1 (PCV2a)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GV2	C57BL/6	Vacina recombinante 1 (PCV2a)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GV3	BALB/c	Vacina recombinante 1 (PCV2a)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GV4	Swiss	Vacina recombinante 2 (PCV2b)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GV5	C57BL/6	Vacina recombinante 2 (PCV2b)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GV6	BALB/c	Vacina recombinante 2 (PCV2b)	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GC-S	Swiss	Água para injeção	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GC-C	C57BL/6	Água para injeção	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas
GC-B	BALB/c	Água para injeção	0,1 mL	12 animais/ 6 semanas

*Dose definida a partir de estudos prévios de dose-resposta (não compõem o presente trabalho).

Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 0,1 mL das vacinas comerciais ou água para injeção de acordo com o respectivo grupo, nos tempos D0 e D14 do estudo. No D0, antes da primeira imunização, foram colhidos aproximadamente 150 µL de sangue dos animais pelo plexo submandibular e no D28, aproximadamente 1000 µL de sangue de cada animal por punção cardíaca.

Para ambas as colheitas de sangue, os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano a uma taxa de 3-5%. Após a colheita de sangue no D28, todos os animais foram eutanasiados com Tiopental (150mg/Kg) por via intracardíaca com os animais sob anestesia com Isoflurano. O sangue colhido foi centrifugado para a separação do soro, que foi armazenado a -20°C para posterior análise no ELISA e os dados obtidos serem avaliados estatisticamente.

4.3.2. Ensaio imunoenzimático indireto *in house* (ELISA indireto *in house*) para mensuração de anticorpos anti-PCV2 em camundongos do Experimento 1

A avaliação da produção de anticorpos pelos camundongos imunizados ou não (grupos controles) foi realizada pelo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) indireto *in house*, previamente desenvolvido e padronizado para esta finalidade, sendo este baseado na metodologia descrita por Sylla e Colaboradores (2014).

Em resumo, para realização do ELISA "*in house*", as placas NUNC foram sensibilizadas com 100µL (100µg/poço) de proteína capsidial de PCV2b purificada e previamente titulada (lote 81020118B, Cambivac Limited - UK) na diluição de 1/1000 em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e mantidas de 2-8°C, *overnight*.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes e bloqueadas pela adição de 200 µL/poço de solução de PBS-Albumina Grau V 1% e incubadas a 37°C por 1 hora. Após o bloqueio e lavagem das placas, 100 µL de diluições de amostra de soro teste, dos controles negativo e positivo, além do branco, em triplicata, foram adicionados aos poços da microplaca como anticorpo primário nas diluições de 1/100 a 1/102.400 em PBS-Tween 20-Albumina Grau II 1% e a reação foi incubada a 37°C por 1 hora.

As placas foram lavadas novamente e 100µL do conjugado *Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat* (SIGMA catálogo A8924) na diluição de 1/8000 em tampão PBS - Tween 20 - Albumina Grau II 1%, foram adicionados como anticorpo secundário em todos os poços da placa, e a reação foi incubada a 37°C, por 1 hora. Após a lavagem, a reação foi revelada pela adição de 100µL da solução substrato-cromógeno para peroxidase (OPD + H₂O₂), que foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos, protegendo-as da luz.

A reação foi interrompida pela adição de 50µL da solução de ácido sulfúrico 3N. Os resultados foram então lidos dentro de um período máximo de 30 minutos com a leitura da absorbância sendo realizada em um filtro de 492 nm.

4.3.3. Soroconversão e critérios de título *end-point* do Experimento 1

Os valores de soroconversão foram obtidos pelo quociente entre a absorbância média de soros de camundongos pós-vacinados e pré-vacinados ($\text{D.O. dia 28}/(\text{D.O. dia 0} * 4)$) em diluição de 1:200. A soroconversão foi considerada positiva quando aumentada quatro vezes (Fisch, 2016).

O título *end-point* foi calculado utilizando-se o valor recíproco da maior diluição de soro que gerou resultado positivo em termos de absorbância, ou seja, esse parâmetro deveria ser maior ou igual a D.O. média de soros negativos somada a 3 vezes o valor de desvio-padrão para as D.Os lidas para o conjunto de soros negativos, sendo estabelecido um ponto de corte (*cut-off*): média + 3 vezes o desvio padrão (Classen et al., 1987).

4.3.4. Análise estatística dos dados do Experimento 1

A análise estatística foi realizada utilizando-se GraphPad Prism versão 9.1.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, por One-way ANOVA, com um valor de $P < 0,05$ considerado significativo.

4.4. Experimento 2 – Prospecção para o estabelecimento de um teste de potência e avaliação comparativa da proteção conferida pelas vacinas recombinantes contra PCV2 após desafio em camundongos vacinados e não vacinados.

A partir dos resultados obtidos no Experimento 1, foi realizado um teste de potência das vacinas recombinantes contra PCV2 optando-se pela utilização de camundongos do estoque genético heterogênico Swiss.

4.4.1. Inóculo de Desafio PCV2b

O inóculo de desafio de PCV2b foi produzido a partir de cultivo viral em células de testículo suíno (células ST) de acordo com técnica previamente padronizada (Cruz e Araújo, 2014) e cedido gentilmente pela Dra. Taís Fukuta da Cruz, do Instituto de Biotecnologia – UNESP, câmpus de Botucatu.

O inóculo foi diluído em solução salina de modo a conter o título de $2,24 \times 10^5$ TCID₅₀ de PCV2b para inoculação de cada camundongo.

4.4.2. Grupos experimentais e delineamento do Experimento 2

Para o estudo de potência das vacinas comerciais contra PCV2, foram utilizados 108 camundongos Swiss, fêmeas, com 4 semanas de idade no dia zero (D0) e 8 semanas de idade na data de desafio experimental (D28). Os animais foram obtidos de fornecedor credenciado e sua utilização foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-OF, sob o protocolo número 099/2021.

Foram estabelecidos 9 grupos experimentais, sendo os animais distribuídos em cada um deles de forma aleatória, respeitando somente o critério de idade, conforme apresentado no Quadro 2.

Os animais foram selecionados, pesados, identificados e vacinados nos momentos D0 e D14. Os animais dos grupos 1 a 6 foram imunizados com vacinas comerciais na dose de 0,1 mL por animal, pela via subcutânea, enquanto os grupos 7 a 9 receberam água de injeção no mesmo volume e via dos grupos vacinados.

Nos momentos D28, D31 e D34 os animais dos grupos 1 a 9 foram desafiados com $2,24 \times 10^5$ TCID₅₀ de PCV2b, no volume de 0,1 mL, também pela via intraperitoneal. Após o desafio, foram monitorados possíveis surgimentos de sinais clínicos associados a infecção por PCV2b.

No momento D35 (1 dia após o último desafio) os animais dos grupos 1, 4 e 7 foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano a uma taxa de 3-5%, tiveram seu sangue colhido por punção cardíaca no volume de aproximadamente 0,9 mL e foram eutanasiados na sequência por sobredose de Cetamina (300mg/Kg) e Xilazina

(30 mg/Kg), pela via intraperitoneal, com os animais ainda sob efeito de anestesia geral com Isoflurano.

Após a eutanásia foram colhidas de cada animal amostras de rim, baço, pulmão e linfonodo cervical. No momento D42 (8 dias após o último desafio) os animais dos grupos 2, 5 e 8 foram submetidos aos mesmos procedimentos citados acima e no D56 (22 dias após o último desafio) os grupos 3, 6 e 9 também tiveram o sangue e órgãos colhidos.

As amostras de sangue foram divididas em duas alíquotas: uma delas foi colocada em microtubo de 1,5mL e congelada a -20°C, enquanto a outra foi centrifugada, e teve o seu soro extraído e congelado em microtubos de 1,5 mL a -20°C. Os órgãos foram armazenados em microtubos de 2,0 mL contendo tampão para conservação de RNA, foram mantidos a 4°C overnight e em seguida congelados a -20°C até o momento das análises.

Sangue total e órgãos foram submetidos a análise da viremia, ou da carga viral, pela técnica de qPCR e o soro sanguíneo foi utilizado para avaliação dos níveis de anticorpos anti-PCV2 por ELISA indireto.

Quadro 2. Dados dos grupos experimentais, inoculação e número de animais para avaliação da potência de vacinas comerciais contra o PCV2.

Grupo	“n” de animais	Idade (semanas)	Vacina (D0 e D14)	Dose Vacina/Animal	Desafio (D28, D31 e D34)	Concentração /volume	Via***	Momento eutanásia
1	12	4 (D0)* 8 (D28)**	Baseada em PCV2b	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D35
2	12	4 (D0) 8 (D28)	Baseada em PCV2b	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D42
3	12	4 (D0) 8 (D28)	Baseada em PCV2b	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D56
4	12	4 (D0) 8 (D28)	Baseada em PCV2a	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D35
5	12	4 (D0) 8 (D28)	Baseada em PCV2a	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D42
6	12	4 (D0) 8 (D28)	Baseada em PCV2a	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	2,24x10 ⁵ /0,1mL	IP	D56

7	12	4 (D0) 8 (D28)	Água de Injeção	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	$2,24 \times 10^5 / 0,1\text{mL}$	IP	D35
8	12	4 (D0) 8 (D28)	Água de Injeção	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	$2,24 \times 10^5 / 0,1\text{mL}$	IP	D42
9	12	4 (D0) 8 (D28)	Água de Injeção	0,1mL	PCV2b em cultivo de células ST	$2,24 \times 10^5 / 0,1\text{mL}$	IP	D56

*4 semanas de idade no D0 – primeira vacinação; **8 semanas de idade no D28 – primeiro desafio com PCV2b;

***Via: IP – intraperitoneal.

4.4.3. Ensaio imunoenzimático indireto *in house* (ELISA indireto *in house*) para o Experimento 2

A avaliação da produção de anticorpos após o desafio experimental, das amostras colhidas nos momentos D35, D42 e D56, foi realizada por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto *in house*, previamente desenvolvido e padronizado para esta finalidade, sendo este baseado na metodologia descrita por Sylla e Colaboradores (2014), de acordo com os procedimentos descritos no item (4.3.2) e com diluições seriadas de 1/1600 a 1/819200.

4.4.4. Critérios de título *end-point* para o Experimento 2

O título *end-point* foi calculado utilizando-se o valor da recíproca da maior diluição de soro que gerou resultado positivo em termos de absorbância, ou seja, esse parâmetro deveria ser maior ou igual a D.O. média de soros negativos somada a 3 vezes o valor de desvio-padrão para as D.Os lidas para o conjunto de soros negativos, sendo estabelecido um ponto de corte (*cut-off*): média D.O. + 3 vezes o desvio padrão (Classen et al. 1987).

4.4.5. Determinação da Carga Viral por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A extração de DNA das amostras de sangue total coletadas dos camundongos foi realizada com 100 µL da amostra usando o kit *Easy Pure Blood Genomic DNA kit (Transgen Biotech)*, conforme as recomendações do fabricante. Um controle da extração consistindo de água livre de nucleases foi incluído na extração. O DNA de cada amostra foi eluído da coluna de purificação com 100 µL do tampão de eluição fornecido pelo kit.

Para a extração de DNA de tecido (pulmão), fragmentos de cada tecido foram pesados (25 mg) e o DNA extraído com o uso do kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante. Um controle da extração consistindo de água livre de nucleases foi incluído no procedimento. O DNA de cada amostra foi eluído da coluna de purificação com 200 µL de água livre de nucleases.

A qPCR para PCV foi realizada com o par de primers sense (5'–GAT GAT CTA CTG AGA CTG TGT GA-3') e anti-sense (5'–AGA GCT TCT ACA GCT GGG ACA-3'), que amplificam um produto de 154 pares de bases (pb) da região ORF1 (Open Reading Frame 1), conservada entre PCV-1 e PCV-2, descritos por Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002).

A reação foi preparada com o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* incluindo o *BRYT Green® Dye*, como fluorocromo intercalante do DNA (Promega), conforme as instruções do fabricante para um volume total de 10 µL, sendo 2 µL do DNA extraído. As condições da reação foram: 95 °C/2 minutos, 40 ciclos de 95 °C/15 segundos, 60 °C/1 minuto seguidos de uma curva de dissociação de 95 °C a 60 °C (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). O controle negativo da reação consistiu de água livre de nucleases. A carga viral de PCV foi determinada pela quantificação absoluta. Para isso, uma curva padrão preparada com as diluições de razão 10 do plasmídeo contendo a sequência gênica alvo de PCV para os primers usados, de $2,1 \times 10^7$ até 21 cópias/µL foi executada. Este plasmídeo foi produzido com o uso do kit *pGEM®-T easy vector system* (Promega), contendo o inserto de PCV de 154 pb, conforme as instruções do fabricante.

4.4.6. Análise estatística dos dados do Experimento 2

A análise estatística foi realizada utilizando-se GraphPad Prism versão 9.1.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, por One-way ANOVA, com um valor de $P < 0,05$ considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados do Experimento 1 - Avaliação da imunogenicidade de duas vacinas recombinantes contra PCV2 em três diferentes linhagens de camundongos

5.1.1. Resposta imune humoral para PCV2 em camundongos vacinados

De acordo com a fórmula aplicada, todos os animais de cada linhagem ou estoque genético outbed avaliados, inoculados com as vacinas baseadas em PCV2a ou PCV2b (grupos GV1 a GV6), soroconverteram 28 dias após a primeira vacinação. Já os animais dos grupos controle mantiveram os níveis inalterados de anticorpos anti-PCV2 em comparação com D0, conforme visto na Tabela 1.

Tabela 1. Soroconversão para anticorpos anti-PCV2 em camundongos vacinados e controles.

Grupo	Linhagem/ Estoque genético	Inóculo	Número de soroconversões/ total de soros testados	
			0	28
GV1	Swiss	Vacina baseada em PCV2a	0/12	12/12
GV2	C57BL/6	Vacina baseada em PCV2a	0/10	10/10 ^a
GV3	BALB/c	Vacina baseada em PCV2a	0/12	12/12
GV4	Swiss	Vacina baseada em PCV2b	0/12	12/12
GV5	C57BL/6	Vacina baseada em PCV2b	0/12	12/12
GV6	BALB/c	Vacina baseada em PCV2b	0/12	12/12
GC-S	Swiss	Água de Injeção	0/12	0/12
GC-C	C57BL/6	Água de Injeção	0/12	0/12
GC-B	BALB/c	Água de Injeção	0/12	0/12

^aDois animais foram à óbito durante a anestesia para colheita de sangue em D0.

A partir da fórmula utilizada para estabelecer os *cut-offs* em cada uma das linhagens/estoque genético avaliados, foram definidos os títulos *end-points* para os grupos experimentais, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Média de D.O.s em cada diluição por grupo experimental, *cut-offs* aplicados e títulos *end-point* estabelecidos para os grupos vacinados.

Diluições e resultados de D.O.													Cut-off	Título End-point
Grupo		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400		
GV1	DO*	1,182	1,124	1,096	1,038	0,917	0,727	0,523	0,338	0,197	0,107	0,056	0,090	51.200
	dp*	0,315	1,138	1,105	1,053	0,930	0,741	0,534	0,345	0,203	0,110	0,057		
GV2	DO	0,993	0,909	0,845	0,745	0,602	0,426	0,275	0,165	0,088	0,050	0,023	0,040	51.200
	dp	0,259	0,287	0,285	0,273	0,258	0,216	0,157	0,107	0,062	0,037	0,021		
GV3	DO	1,288	1,243	1,182	1,051	0,890	0,704	0,520	0,359	0,225	0,135	0,075	0,049	102.400
	dp	0,376	0,363	0,385	0,405	0,406	0,396	0,348	0,289	0,202	0,133	0,080		
GV4	DO	1,193	1,134	0,980	0,843	0,652	0,492	0,352	0,228	0,135	0,074	0,041	0,090	25.600
	dp	0,203	0,216	0,235	0,274	0,251	0,246	0,191	0,134	0,088	0,050	0,026		
GV5	DO	0,911	0,858	0,771	0,677	0,557	0,427	0,306	0,211	0,132	0,079	0,045	0,040	102.400
	dp	0,282	0,290	0,293	0,301	0,285	0,234	0,180	0,130	0,085	0,053	0,031		
GV6	DO	1,200	1,099	0,959	0,801	0,633	0,473	0,332	0,231	0,143	0,082	0,045	0,049	51.200
	dp	0,330	0,372	0,392	0,390	0,344	0,289	0,219	0,162	0,105	0,067	0,039		
GC-S	DO	0,042	0,021	0,008	0,003	0,002	0,002	0,002	-0,002	0,001	0,001	-0,001	-	-
	dp	0,016	0,010	0,007	0,005	0,004	0,008	0,009	0,002	0,004	0,006	0,002		
GC-C	DO	0,017	0,009	0,003	0,003	0,000	-0,003	-0,001	0,004	-0,002	-0,002	-0,003	-	-
	dp	0,008	0,010	0,004	0,010	0,008	0,004	0,006	0,021	0,003	0,004	0,003		
GC-B	DO	0,018	0,009	0,007	0,001	0,003	-0,002	-0,003	-0,003	-0,002	-0,001	-0,003	-	-
	dp	0,010	0,007	0,013	0,004	0,009	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003		

*DO: Densidade óptica média para cada grupo; dp: desvio-padrão da média.

5.1.2. Títulos de anticorpos para PCV2

O estoque genético heterogênico (Swiss) e as duas linhagens isogênicas de camundongos (C57BL/6 e Balb/C) testadas mostraram um aumento no título de anticorpos após a vacinação, de forma que os grupos GV1 e GV2 mantiveram todos os animais acima do *cut-off* até a diluição de 1/400 enquanto no grupo GV3 esta condição foi observada até a diluição de 1/800. Nos grupos GV4 e GV5, todos os animais permaneceram acima do *cut-off* até a diluição de 1/3200 enquanto no grupo GV6 esta condição foi detectada até a diluição de 1/12800. Cada um dos grupos vacinados apresentou 01 (um) animal com resposta de D.O. abaixo dos demais animais, o que reduziu o número de diluições em que todos os animais se mantiveram acima do *cut-off*, conforme dados apresentados nas Figuras 4, 5 e 6.

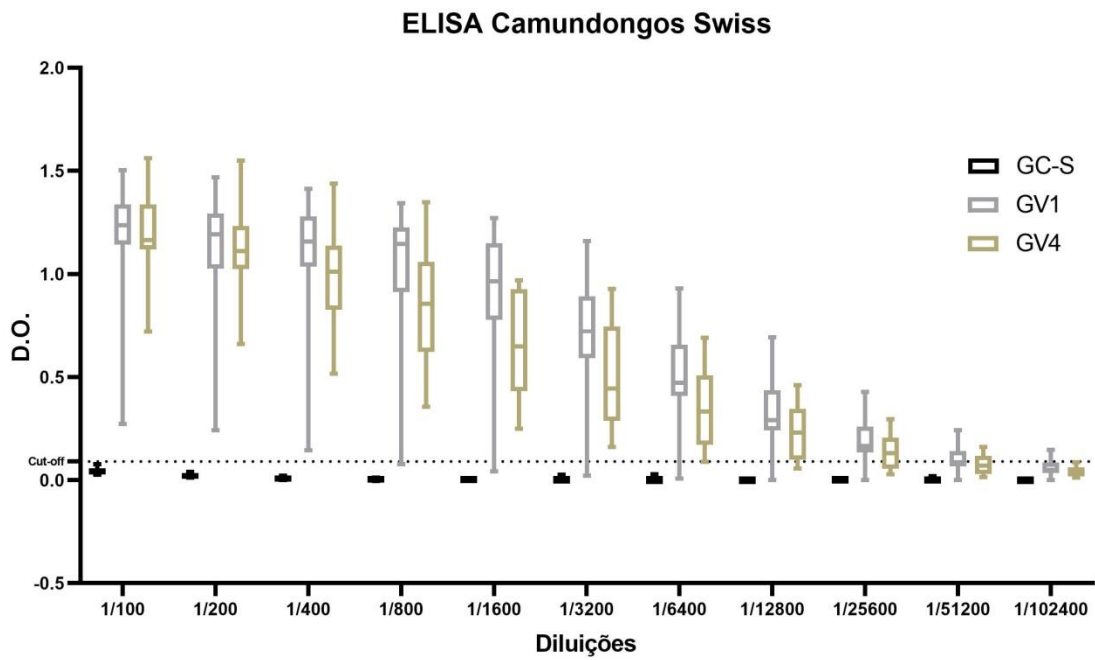


Figura 4. Dados de absorbância para o estoque genético Swiss em todas as diluições testadas para os grupos GC-S, GV1 e GV4.

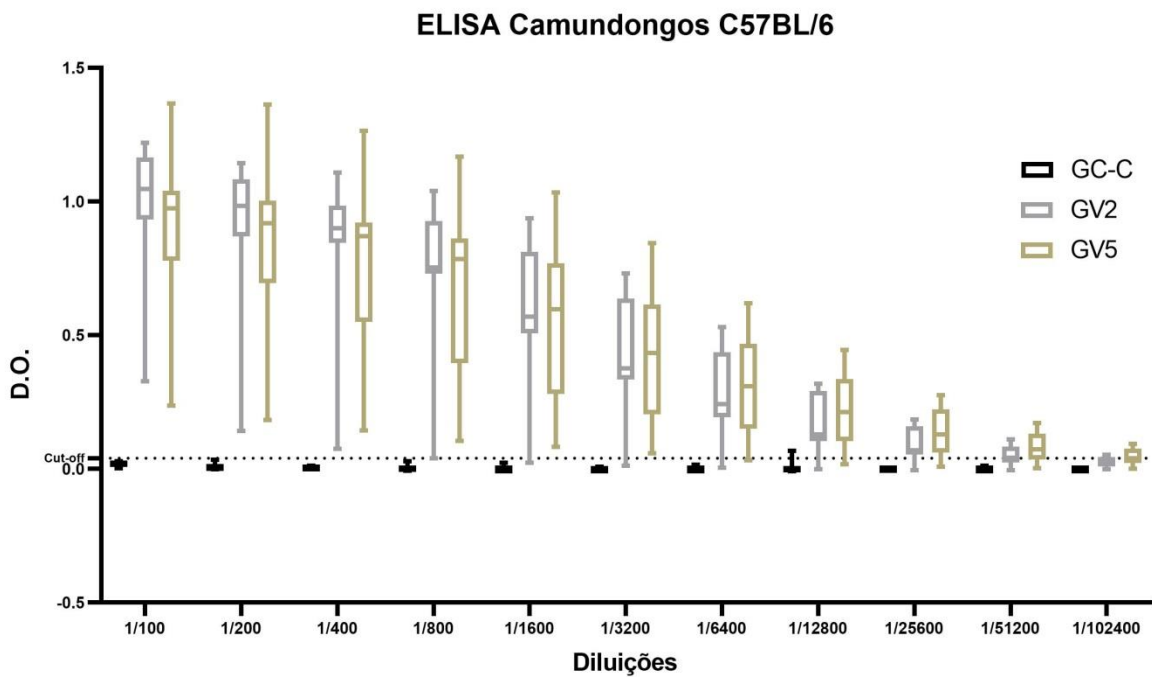


Figura 5. Dados de absorbância para a linhagem C57BL/6 em todas as diluições testadas para os grupos GC-C, GV2 e GV5.

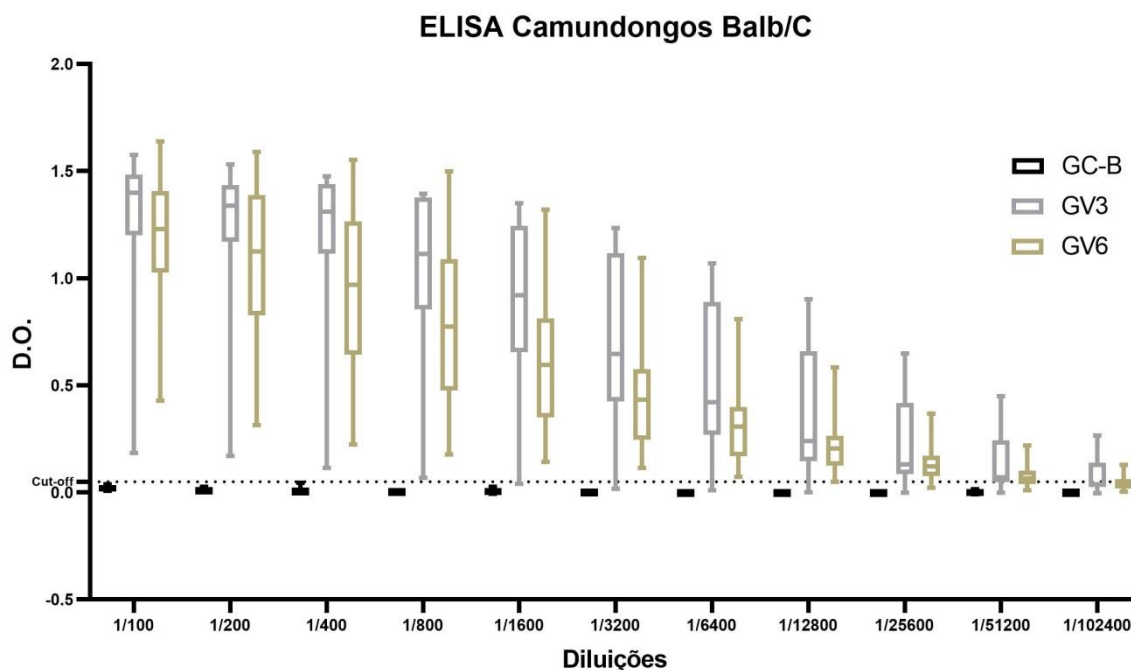


Figura 6. Dados de absorbância para a linhagem BALB/c em todas as diluições testadas para os grupos GC-B, GV3 e GV6.

Apesar disso, todos os grupos vacinados apresentaram títulos médios elevados de anticorpos nas diluições testadas, enquanto os grupos controle mantiveram os títulos abaixo dos *cut-offs* estabelecidos para cada linhagem/estoque genético. Os títulos médios apresentados foram de 1/25600 no grupo GV4 a 1/51200 nos grupos GV1, GV2 e GV6, enquanto nos grupos GV3 e GV5 os títulos permaneceram na diluição máxima (1/102400), como pode ser visto na Figura 7.

Ao comparar os títulos médios dos grupos vacinados, não houve diferença estatisticamente significativa (valor $P = 0,0631$) nos títulos de anticorpos anti-PCV2 entre as linhagens e o estoque genético de camundongos testados, tanto para os animais vacinados com vacina baseada em PCV2a quanto para os animais vacinados com vacina baseada no genótipo PCV2b.

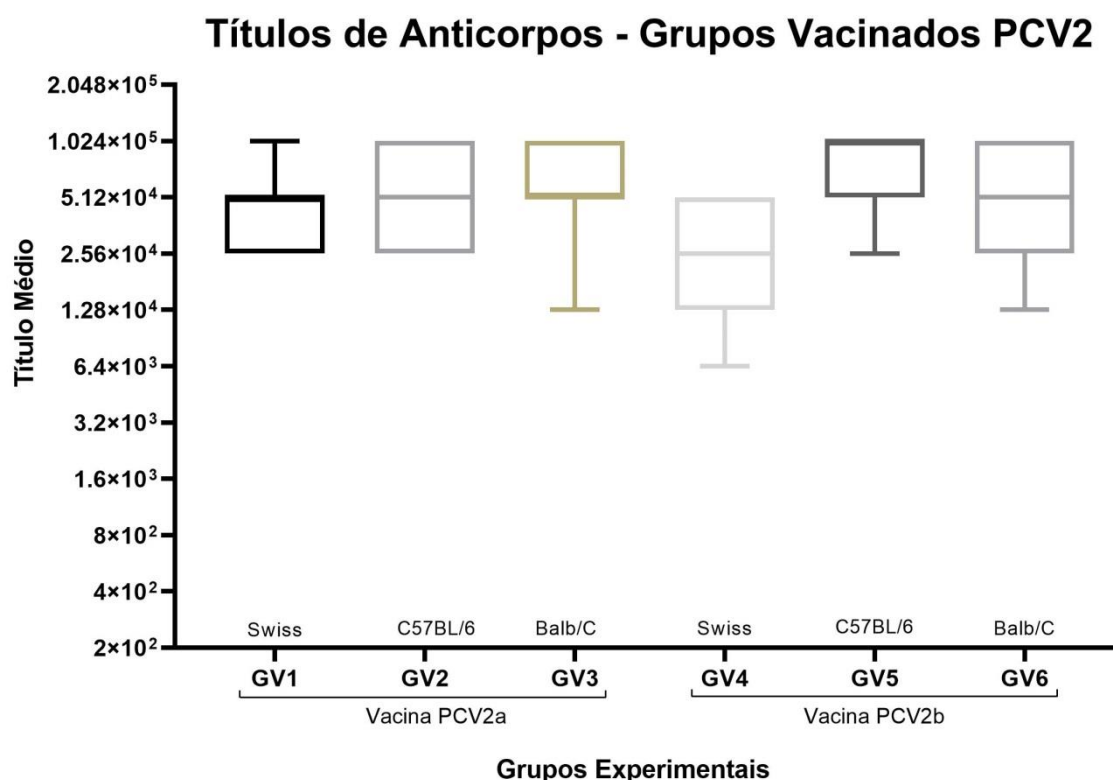


Figura 7. Média de títulos de anticorpos para PCV2 em cada linhagem ou estoque genético e vacinas testadas.

5.2. Resultados do Experimento 2 - Estabelecimento de teste de potência e avaliação comparativa da proteção conferida pelas vacinas recombinantes contra PCV2 após desafio em camundongos.

5.2.1. Análise sorológica das amostras por ELISA (ELISA indireto *in house*)

A partir da fórmula utilizada para estabelecer os *cut-offs* nas amostras colhidas nos momentos D35, D42 e D56, foram definidos os títulos *end-points* para os grupos experimentais. Os animais dos grupos 4 e 6 tiveram seus títulos na diluição máxima (1/819200), enquanto os grupos 1, 3 e 5 apresentaram título de 1/204800 e o grupo 2 teve título de 1/102400, conforme dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Média de D.O.s em cada diluição por grupo experimental, *cut-offs* aplicados e títulos *end-point* estabelecidos para os grupos vacinados.

Diluições e resultados de D.O.											Cut-off	Título End-point	
Grupo		1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600			1/819200
1	DO*	0,989	0,782	0,604	0,440	0,303	0,216	0,137	0,095	0,074	0,060	0,083	204.800
	dp*	0,387	0,400	0,381	0,321	0,250	0,177	0,112	0,066	0,035	0,020		
2	DO	1,264	1,107	0,949	0,749	0,563	0,396	0,264	0,179	0,121	0,085	0,185	102.400
	dp	0,403	0,409	0,418	0,392	0,334	0,264	0,185	0,121	0,072	0,040		
3	DO	1,487	1,268	1,044	0,814	0,600	0,414	0,271	0,183	0,124	0,096	0,179	204.800
	dp	0,314	0,382	0,406	0,383	0,332	0,243	0,161	0,095	0,055	0,036		
4	DO	1,452	1,317	1,164	0,949	0,718	0,512	0,345	0,220	0,147	0,103	0,083	819.200
	dp	0,181	0,263	0,317	0,353	0,332	0,262	0,194	0,120	0,076	0,043		
5	DO	1,555	1,450	1,300	1,093	0,862	0,624	0,400	0,257	0,163	0,110	0,185	204.800
	dp	0,208	0,253	0,275	0,269	0,254	0,204	0,138	0,089	0,052	0,033		
6	DO	1,897	1,813	1,712	1,524	1,273	0,964	0,665	0,444	0,286	0,196	0,179	819.200
	dp	0,159	0,174	0,221	0,289	0,344	0,320	0,272	0,200	0,135	0,094		
7	DO	0,069	0,058	0,053	0,051	0,048	0,046	0,047	0,046	0,045	0,045	-	-
	dp	0,005	0,007	0,003	0,004	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002		
8	DO	0,127	0,124	0,096	0,088	0,086	0,073	0,057	0,056	0,051	0,055	-	-
	dp	0,019	0,031	0,017	0,014	0,026	0,013	0,007	0,020	0,009	0,014		
9	DO	0,113	0,112	0,092	0,080	0,079	0,076	0,056	0,056	0,060	0,063	-	-
	dp	0,022	0,018	0,013	0,013	0,020	0,019	0,006	0,007	0,014	0,020		

*DO: Densidade óptica média para cada grupo; dp: desvio-padrão da média.

Independente da vacina recebida ou do momento de colheita das amostras, todos os grupos de animais vacinados apresentaram grande incremento de anticorpos anti-PCV2 quando comparados aos grupos não vacinados e somente desafiados, inclusive havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre estes (Figuras 8, 9, 10 e Quadro 3). Um animal do grupo 2, referente ao momento D42, não teve resposta ao estímulo vacinal e manteve valores de DO abaixo do *cut-off* em todas as diluições testadas.

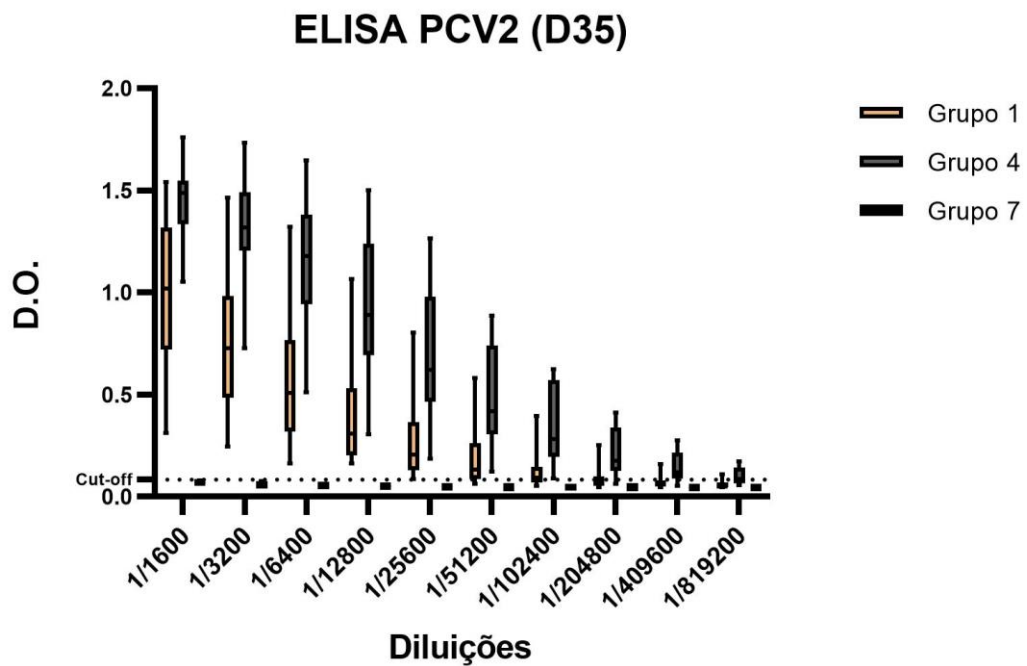


Figura 8. Dados de absorbância para os grupos 1, 4 e 7 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D35.

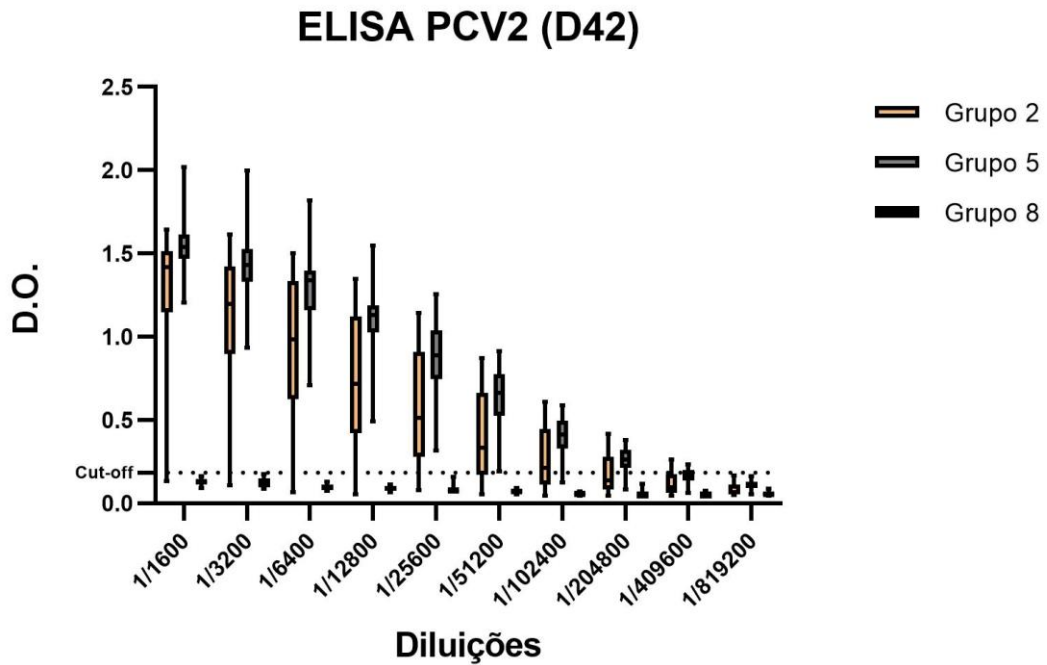


Figura 9. Dados de absorbância para os grupos 2, 5 e 8 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D42.

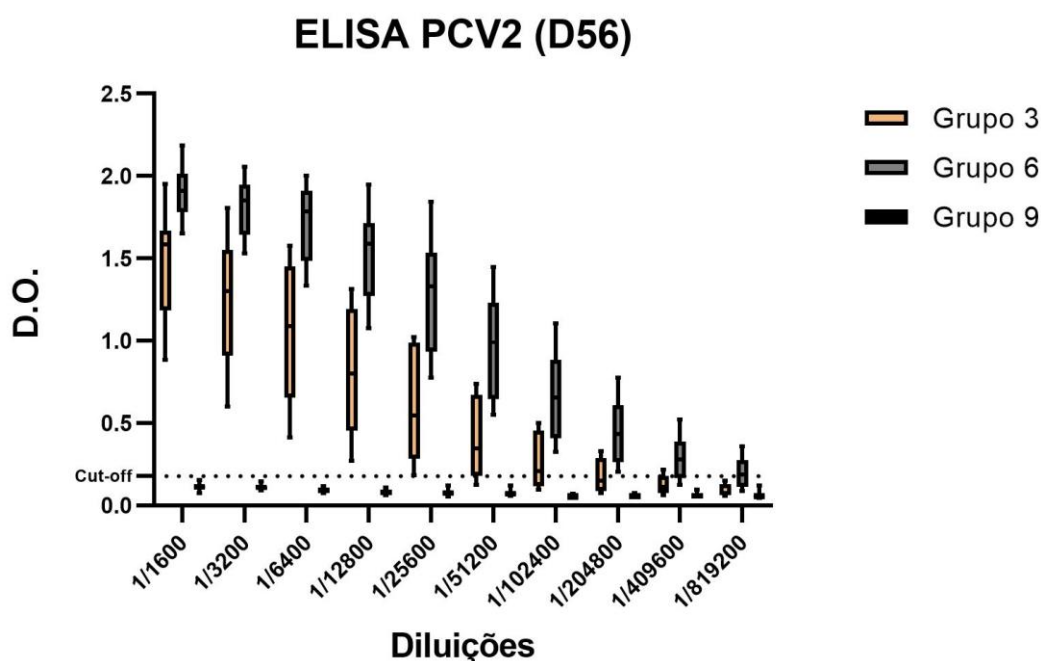


Figura 10. Dados de absorbância para os grupos 3, 6 e 9 (não vacinado), nas diluições testadas, sendo as amostras colhidas no momento D56.

Quadro 3. Análise estatística por One-way ANOVA dos grupos vacinados *versus* não vacinados nos momentos D35, D42 e D56.

Momento	Comparações entre Grupos	Diferença Estatística	Valor de <i>p</i>
D35	Grupo 1 vs Grupo 7	Sim	0,0246
	Grupo 4 vs Grupo 7	Sim	0,0059
D42	Grupo 2 vs Grupo 8	Sim	0,0116
	Grupo 5 vs Grupo 8	Sim	0,0057
D56	Grupo 3 vs Grupo 9	Sim	0,0136
	Grupo 6 vs Grupo 9	Sim	0,0018

Do momento inicial de análise (D35) ao momento final (D56), houve aumento gradativo nas médias de DOs dos grupos vacinados, sendo $D56 > D42 > D35$, conforme Quadro 3 e Figura 11. Apesar disso, somente foi observada diferença estatística ($P = 0,0305$) entre os Grupos 1 e 6, sendo o primeiro com amostras obtidas no D35 e o segundo no D56, ambos inoculados com a mesma vacina comercial.

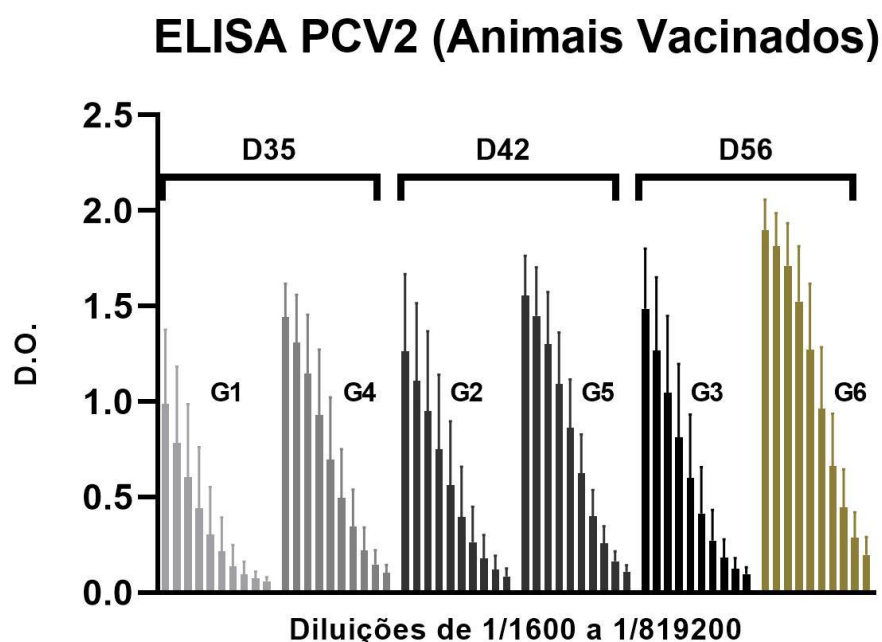


Figura 11. Aumento das médias de DO dos grupos vacinados que tiveram amostras colhidas nos momentos D35 (Grupos 1 e 4), D42 (Grupos 2 e 5) e D56 (Grupos 3 e 6).

Quando os grupos 7, 8 e 9, somente desafiados, foram comparados entre si, foi possível observar que as menores médias de DOs ocorreram no Grupo 7, o que gerou diferença estatística quando este foi comparado aos grupos 8 e 9. O grupo 8 (D42) apresentou as médias de DOs das primeiras diluições (1/1600 a 1/25600) superiores às do grupo 9, enquanto nas diluições finais esta condição oscilou entre os grupos (Quadro 4 e Figura 12). Não houve diferença estatística entre esses grupos.

Quadro 4. Análise estatística por One-way ANOVA dos grupos 7, 8 e 9 – não vacinados e desafiados.

Comparações entre Grupos	Diferença Estatística	Valor de <i>p</i>
Grupo 7 vs Grupo 8	Sim	0,0222
Grupo 7 vs Grupo 9	Sim	0,0077
Grupo 8 vs Grupo 9	Não	0,9920

ELISA PCV2 (Animais Somente Desafiados)

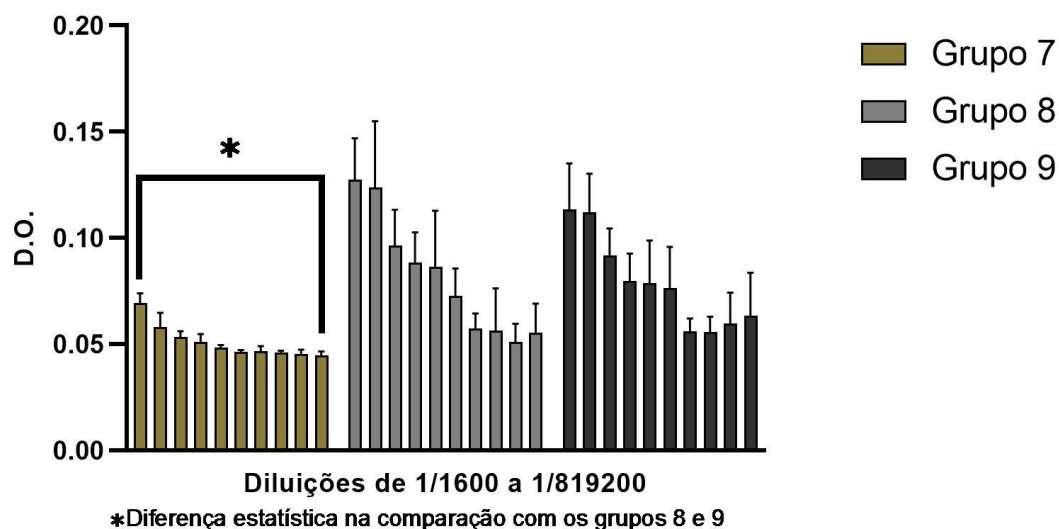


Figura 12. Médias de DOs nos grupos de camundongos não vacinados e desafiados, demonstrando diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo 7 e os grupos 8 e 9.

5.2.2. Determinação da Carga Viral por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

As amostras de sangue total foram analisadas para quantificação da carga viral conforme metodologia proposta e apresentaram resultados negativos. Optou-se então por analisar as amostras de pulmão e estas também apresentaram resultado negativo para presença de PCV2 na técnica de qPCR. Por este motivo, as amostras de rim, baço e linfonodo não foram analisadas por qPCR.

6. DISCUSSÃO

6.1. Resposta imune humoral para PCV2 em camundongos isogênicos e heterogênicos

No Experimento 1, buscou-se demonstrar a viabilidade de estoques genéticos heterogênicos de camundongos para avaliação da imunogenicidade de vacinas de PCV2 e provar que a limitação na escolha de modelos de camundongos para estudos de resposta humoral em vacinas, incluindo as direcionadas ao Circovirus Suíno Tipo 2 (PCV2), pode estar mais relacionada à ausência de dados caracterizando esses animais como possíveis modelos experimentais para este tipo de avaliação do que os resultados que eles fornecem.

Por muito tempo, linhagens de camundongos isogênicos têm sido utilizadas em detrimento dos animais heterogênicos, como por exemplo, os camundongos C57BL/6 e Balb/C, amplamente utilizados em aplicações biomédicas de impacto científico. A escolha por um modelo animal experimental já descrito e majoritariamente baseado em animais isogênicos é citada por Festing (2014) como sendo uma escolha pelo caminho “mais fácil”, uma vez que realizar um estudo para compará-los com novas opções de modelos é trabalhoso e torna o processo mais lento.

O estabelecimento dos *cut-offs* e títulos *end-points* revelaram que a linhagem Balb/C apresentou todos os animais, tanto do grupo GV3 quanto do GV6, por um número maior de diluições de soro acima do ponto de corte da detecção de anticorpos no ELISA, enquanto o a linhagem C57BL/6 e o estoque genético Swiss apresentaram essa condição semelhante entre si, mas em diluições menores do que a observada para os camundongos Balb/C. Esta condição pode ser favorável em termos de identificação de um maior nível de resposta humoral frente a uma vacina a ser testada, porém pode dificultar uma correlação com a espécie alvo, caso esta possua um padrão de resposta mais diverso e com menor estímulo que o observado no modelo de camundongos.

O incremento de anticorpos anti-PCV2 em camundongos Balb/C observado no presente estudo está em concordância com estudos anteriores que utilizaram essa linhagem com objetivo de avaliar a resposta imune humoral para várias

construções vacinais contra PCV2 (Aravindaram et al., 2009; Zhang et al., 2015; Fan et al., 2015; Li et al., 2016; Ouyang et al., 2018). Além disso, um aumento semelhante nos níveis de anticorpos anti-PCV2 observados na linhagem C57BL/6 neste estudo, foi encontrado por Zhang e colaboradores (2017). Estudos para avaliação da resposta imune humoral frente às vacinas de PCV2 utilizando camundongos Swiss como modelo não foram encontrados em publicações anteriores.

Os resultados de soroconversão e títulos de anticorpos encontrados no Experimento 1 demonstraram que não houve diferença significativa tanto entre as linhagens isogênicas de camundongos quanto na comparação destas com camundongos heterogênicos, o que é consistente com estudos em que também não houve diferenças entre as linhagens e estoques genéticos de camundongos submetidos à imunização com outras preparações antigênicas (Tuttle et al., 2018).

A ausência de diferenças estatísticas entre os grupos vacinados indica que, independentemente da construção vacinal e dos genótipos de PCV2 nas quais as vacinas se baseiam (PCV2a ou PCV2b), camundongos isogênicos e heterogênicos utilizados são capazes de produzir incrementos de anticorpos 28 dias após duas doses de vacinas recombinantes comerciais contra PCV2, e podem ser utilizados como modelo para avaliação das respostas humorais para vacinas contra PCV2.

No Experimento 2, foi possível confirmar que vacinas contra PCV2 podem gerar grande incremento de resposta imune humoral em camundongos Swiss, pois todos os grupos de camundongos vacinados revelaram níveis de anticorpos estatisticamente diferentes dos grupos não vacinados, com valores médios de absorbância no método indireto de ELISA substancialmente maiores que aqueles vistos nos grupos somente desafiados. Como complemento ao que foi verificado no Experimento 1 quando avaliou-se o nível de anticorpos anti-PCV2 até o momento D28, no Experimento 2 as médias de DOs permitiram verificar uma amplificação na resposta humoral, sendo que houve um incremento gradativo desde o primeiro tempo de análise (D35), com D42 como ponto intermediário e maior resposta no D56.

Quanto aos grupos de animais que foram somente desafiados com PCV2b, identificou-se um baixo estímulo de resposta humoral quando comparado aos

grupos vacinados, porém houve um incremento de resposta desde D35 até o D56 e os valores médios de DOs foram estatisticamente diferentes e menores que os observados nos momentos D42 e D56, que não diferiram estatisticamente entre si.

Este incremento de resposta humoral pode indicar a ocorrência de resposta imune de memória após estímulo ocasionado pelos desafios com PCV2b realizados nos momentos D28, D31 e D34, pois apesar de não haver um grupo controle negativo ou amostras de soros colhidas antes da vacinação, o soro colhido no momento D35 apresentou média mais próxima àquela observada no grupo controle do Experimento 1 (Grupo GC-S) e pode ser utilizada como base para se observar um aumento dessa resposta, inclusive considerando a diferença estatística citada anteriormente.

A partir dos resultados obtidos tanto no Experimento 1 quanto no Experimento 2 é possível afirmar que camundongos Swiss têm capacidade de gerar resposta imune humoral após inoculados com vacinas contra PCV2, apresentando incremento suficiente para gerar soroconversão e diferenças estatísticas em relação aos animais não vacinados. Além disso, a resposta imune humoral gerada pode ser observada de forma crescente desde o momento D28 (14 dias após a segunda dose da vacina) até o momento D56 (42 dias após a segunda dose).

Para que seja possível comprovar que camundongos heterogênicos possuem uma vantagem em relação aos isogênicos para avaliação de vacinas veterinárias quanto ao fato de a espécie alvo também ser composta por indivíduos heterogênicos, são necessários estudos que visem à correlação das respostas obtidas em camundongos isogênicos e heterogênicos com aquelas observadas na espécie alvo, os suínos. No entanto, no presente estudo foram utilizadas vacinas já aprovadas para comercialização pela autoridade regulatória e previamente submetidas aos mais diversos controles de qualidade, que incluem estudos de eficácia na espécie alvo durante seu desenvolvimento.

6.2. Desafio de camundongos Swiss com PCV2 e avaliação da carga viral

Apesar de os dados de sorologia indicarem algum estímulo de resposta humoral nos momentos D42 e D56 após o desafio, as análises de RT-qPCR revelaram que o inóculo de PCV2 não foi suficiente para gerar infecção e replicação viral nos camundongos, o que sugere que pelo menos com o delineamento proposto, camundongos Swiss não são um modelo adequado quando se objetiva um estudo de potência baseado em desafio com PCV2.

Dentre as possíveis causas para o não desenvolvimento de sinais clínicos e detecção de carga viral nos animais, inclusive aqueles não vacinados, pode-se destacar a idade dos animais no momento do desafio, além da linhagem ou estoque genético utilizado. Estudos prévios descrevem que o uso de camundongos como modelo para PCV2, principalmente quando se trata de desafio experimental, é controverso e pode ter limitações relacionadas à idade ou à linhagem de camundongos utilizados (Opriessnig et al., 2009; Castro et al., 2015). No Experimento 2 foram desafiados animais com 8 semanas de idade, pois foi respeitado o intervalo para incremento da resposta imune testada no Experimento 1, o que ocorreu do momento D14 quando os animais receberam a segunda dose da vacina até o momento D28, quando foi realizado o primeiro desafio com PCV2.

A capacidade de animais heterogênicos em gerar resposta imune humoral pode não ser proporcional à susceptibilidade para desenvolver sinais clínicos e viremia ou carga viral em órgãos, pois, componentes específicos da resposta imune inata e as variações genéticas e individuais do hospedeiro modulam as vias de tolerância à patogenicidade específica frente a alguns agentes infecciosos (Resende et al., 2008; Castro et al., 2015). Ademais, deve-se considerar que as moléculas de MHC de Classe I (MHC-I) desempenham um importante papel no reconhecimento imunológico de patógenos intracelulares para a ativação e respostas mediadas por linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e alguns haplótipos como o H2 d, encontrado em camundongos Balb/C, podem explicar sua maior susceptibilidade à infecção pelo PCV2. Neste sentido, o papel do MHC-I em camundongos Swiss poderia explicar a ausência de susceptibilidade ao PCV2 observada no presente estudo (Opriessnig et al., 2009; Castro et al., 2015).

Outro fato que pode explicar o resultado obtido é a influência da resposta imune inata na resposta adaptativa no que tange ao padrão Th1 e Th2. Enquanto a linhagem de camundongos C57BL/6 é reconhecida pela dominância do perfil Th1, camundongos Balb/C possuem perfil Th2. A natureza dos macrófagos encontrada em cada uma dessas linhagens gera diferentes estímulos na resposta adaptativa e por consequência, impacto na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças (Watanabe et al., 2004). Sunagar e Colaboradores (2018) citam que a capacidade de incremento de resposta imune em camundongos Swiss pode ser correlacionada com menor atividade infamatória e dano tecidual, baseado nas respostas de células TCD4 e TCD8.

A despeito disso tudo, a ausência de resultados satisfatórios na tentativa de infecção de camundongos Swiss com PCV2 não limita a utilização deste estoque genético como modelo para avaliação de vacinas veterinárias, mais especificamente contra o Circovirus Suíno. É crescente o movimento regulatório para refinamento e redução no uso de animais para avaliação de vacinas, principalmente aqueles experimentos que causem dor e distresse. Nesse sentido, modelos para estudos de potência que eliminem a necessidade de desafio são mais adequados do ponto de vista ético e humanitário, sendo que o modelo baseado somente em avaliação sorológica atende de melhor forma a estes princípios (Stokes et al., 2011) e, ademais, pela literatura consultada disponível, o presente estudo se constitui na primeira vez que camundongos heterogênicos Swiss são usados para a avaliação da imunogenicidade e potência de vacinas contra o PCV2.

7. CONCLUSÕES

Camundongos heterogênicos Swiss podem ser usados como modelo para avaliação da potência de vacinas para PCV2 com base na soroconversão e na resposta imune humoral contra esse vírus.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afghah Z, Webb B, Meng XJ, Ramamoorthy S (2017) Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility? **Vet Microbiol.** 206:21-28.

Aguilera BE, Chavez-Calvillo G, Elizondo-Quiroga D, et al. (2017) Porcine circovirus type 2 protective epitope densely carried by chimeric papaya ringspot virus-like particles expressed in *Escherichia coli* as a cost-effective vaccine manufacture alternative. **Biotechnol Appl Biochem.** 64:406-414.

Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GAC, Adair B, Ellis WA, McNulty MS (1995) Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Vet. Microbiol.** 44:49–64.

Allan GM, Mcneilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM (1998) Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and europe. **J. Vet. Diagn. Investig.** 10:3–10.

Aravindaram K, Kuo TY, Lan CW, Yu HH, Wang PH, Chen YS, Chen GH, Yang NS (2009) Protective immunity against porcine circovirus 2 in mice induced by a gene-based combination vaccination. **J. Gene. Med.**11(4):288-301.

Beach NM, Meng XJ (2012) Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Res.** 164:33–42.

Beach NM, Ramamoorthy S, Opriessnig T, Wu SQ, Meng XJ (2010) Novel chimeric porcine circovirus (PCV) with the capsid gene of the emerging PCV2b subtype cloned in the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 is attenuated in vivo and induces protective and cross-protective immunity against PCV2b and PCV2a subtypes in pigs. **Vaccine** 29:221–232.

Carman S, Cai HY, Delay J, Youssef SA, Mcewen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusi P, Fairles J, et al. (2008) 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. **Can. J. Vet. Res.** 72:259–268.

Carman S, McEwen B, Delay J, Van Dreumel T, Lusk P, Cai H, Fairles J (2006) Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). **Can. Vet. J.**, 47:761–762.

Castro AM, Cruz TF, Yamada KB, Gerber PF, Gabardo MP, Araujo Jr JP, et al. (2015) Preliminary evidence of age-dependent clinical signs associated with porcine circovirus 2b in experimentally infected CH3/Rockefeller mice. **Res. Vet. Sci.** 103:70–72.

Chae C (2012) Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. **Vet. J.** 194:151–157.

Cheung AK (2003) Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology.** 305:168–180.

Cheung AK, Lager KM, Kohutnyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, et al. (2007) Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Arch. Virol.** 152(5):1035–44.

Ciacchi-Zanella JR (2017) Situação atual da circovirose no Brasil. **Anais Congresso ABRAVES** – Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos. Goiânia, GO, 150-156.

Ciacchi-Zanella J, Mores N (2003) "Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 55(5):522-527.

Ciacchi-Zanella JR, Mores N, Simon NL, Oliveira SR, Gava D (2006) Identificação de circovirus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural** 36(5):1480-1485.

Ciacchi-Zanella JR, Schaefer R, Gava D, Morés N, Barcellos DESN (2015) **Novos conhecimentos sobre a infecção por PCV2 e a emergência de novas estirpes virais. Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos.** D. E. B. F. P. B. I. W. M. L. Bernardi. Porto Alegre, UFRGS Gráfica. 1:207-220.

Clark EG (1996) Pathology of postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc Western Can Assoc Swine Pract.* In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.) **Diseases of Swine**. USA: Wiley-Blackwell, p.378.

Classen DC, Morningstar JM, Shanley JD (1987) Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. **J. Clin. Microbiol.** 25(4):600-4.

Constans M, Ssemadaali M, Kolyvushko O, Ramamoorthy S (2015) Antigenic determinants of possible vaccine escape by porcine circovirus subtype 2b viruses. **Bioinform. Biol. Insights** 9:1–12.

Craveiro AM (2008) Biotecnologia e biossegurança na produção de vacinas e Kits diagnóstico. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.11, suplemento 1, p.123-125.

Cruz TF, Araujo JP Jr. (2014) Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. **J Virol Methods**. 2014 196:82-5.

Drolet R, Thibault S, D'allaire S, Thomson J, Done S (1999) Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. **Swine Health Prod.** 7:283–285.

Ellis J (2014) Porcine circovirus. **Vet. Pathol.** 51:315–327.

Fan Y, Guo L, Hou W, et al. (2015) The adjuvant activity of epimedium polysaccharide-propolis flavone liposome on enhancing immune responses to inactivated porcine circovirus vaccine in Mice. **Evid. Based Complement Alternat. Med.** 2015:972083.

Festing MF (2014) Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. **ILAR J.** 55:399–404.

Finsterbusch T, Mankertz A (2009) Porcine circoviruses—small but powerful. **Virus Res.** 143:177–183.

Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC (2009) Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: Porcine circovirus 2. **J. Virol.**, 83:12813–12821.

Fisch A, Marchioro SB, Gomes CK, Galli V, de Oliveira NR, Simionatto S, Dellagostin OA, Mendonça M, Moreira ÂN, Conceição FR (2016) Commercial bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine immune system. **Trials Vaccinol.** 5:32–7.

Fort M, Sibila M, Nofrarias M, Pérez-Martín E, Olvera A, Mateu E, Segalés J (2012) Evaluation of cell-mediated immune responses against porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins after vaccination with a commercial PCV2 sub-unit vaccine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 150:128–132.

Fort M, Sibila M, Pérez-Martín E, Nofrarias M, Mateu E, Segalés J (2009) One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. **Vaccine**, 27:4031–4037.

Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, Drigo M (2016) Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. **Sci. Rep.** 6: 39458.

Franzo G, Segalés J (2018) Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. **PLoS ONE** 13(12):e0208585.

Franzo G, Segalés J (2020) Porcine circovirus 2 genotypes, immunity and vaccines: multiple genotypes but one single serotype. **Pathogens** 9, 1049.

Gao Z, Dong Q, Jiang Y, et al. (2013) Identification and characterization of two novel transcription units of porcine circovirus 2. **Virus Genes.** 47:268-275.

Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V (2009) Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease J. **Vet. Intern. Med.**, 23:(6).

Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, Lopez SS, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olvera A, Segalés J (2008) A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Vet.. Microbiol.**, 128:23-35.

Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China. **Virol. J.** 7:273.

Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, et al. (2012) A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. **PLoS ONE**, 7, e41463.

Guo, XQ, Wang LQ, Qiao H, Yang XW, Yang MF, Chen HY (2015) Enhancement of the immunogenicity of a porcine circovirus type 2 DNA vaccine by a recombinant plasmid coexpressing capsid protein and porcine interleukin-6 in mice. **Microbiol. Immunol.** 59:174-180.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GP (1998) Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J. Virol.** 72:5262-5267.

Harding JC (2004) The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Vet. Microbiol.** 98(2):131-5.

Harding JC (1996) Post-weaning multisystemic wasting syndrome: Preliminary epidemiology and clinical findings. Proc. West. Can. Assoc. **Swine Practic.**, p.21.

Harding JCS, Clark EG (1997) Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, 5:201–203.

Jeong J, Park C, Choi K, Chae C (2015) Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. **Vet. Microbiol.**, 177:43–52.

Jung BK, Kim HR, Lee YH, Jang H, Chang KS (2019) Comparison of Immune Responses to the PCV2 Replicase-Capsid and Capsid Virus-Like Particle Vaccines in Mice. **J. Microbiol. Biotechnol.** 28;29(3):482-488.

Karuppannan AK, Opriessnig T (2017) Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. **Viruses.** 9:99.

Kekarainen T, McCullough K, Fort M, Fossum C, Segalés J, Allan GM (2010) Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 136:185–193.

Khayat R, Brunn N, Speir JA, Hardham JM, Ankenbauer RG, Schneemann A, Johnson JE (2011) The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. **J. Virol.**, 85:7856–7862.

Kim K, Hahn T-W (2021) Evaluation of novel recombinant porcine circovirus type 2d (PCV2d) vaccine in pigs naturally infected with PCV2d, **Vaccine**, 39(3): 529-535.

Klaumann F, Correa-Fiz F, Franzo G, Sibila M, Núñez JI, Segalés J (2018) Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry. **Front Vet Sci.** 5:315.

Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL, Mittal SK (2001) Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. **Vet. Pathol.** 38:74-82.

Krakovka S, Hartunian C, Hamberg A, Shoup D, Rings M, Zhang Y, Allan G, Ellis JA (2008) Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. **Am J Vet. Res.** 69(12):1615-22.

Kwon T, Lee DU, Yoo SJ, Je SH, Shin JY, Lyoo YS (2017) Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. **Virus. Res.** 228:24–29.

Ladekjær-Mikkelsen AS, Nielsen J, Stådejek T, Storgaard T, Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Allan G, Botner A (2002) Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2) **Vet. Microbiol.** 89(2-3):97–114.

Li D, Du Q, Wu B, Li J, Chang L, Zhao X, Huang Y, Tong D (2017) Immunogenicity of adenovirus vaccines expressing the PCV2 capsid protein in pigs. **Vaccine.** 35(36):4722–9.

Li DL, Huang Y, Chang LL, et al. (2016) Modified recombinant adenoviruses increase porcine circovirus 2 capsid protein expression and induce enhanced immune responses in mice. **Acta Virol.** 60:271-280.

Li J, Yuan X, Zhang C, et al. (2010) A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. **Virol. J.** 7:158.

Liu X, Ouyang T, Ma T. et al. (2018) Immunogenicity evaluation of inactivated virus and purified proteins of porcine circovirus type 2 in mice. **BMC Veterinary Research.** 14:137.

Link EK, Eddicks M, Nan L. et al. (2021) Discriminating the eight genotypes of the porcine circovirus type 2 with TaqMan-based real-time PCR. **Virol. J.** 18:70.

Lv Q, Guo K, Xu H, et al. (2015) Identification of putative ORF5 protein of porcine circovirus type 2 and functional analysis of GFP-fused ORF5 protein. **PLoS ONE.**10(6)

Lv QZ, Guo KK, Zhang YM (2014) Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. **Virus Genes.** 49(1):1–10.

Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, Buhk HJ (1998) Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. **J. Gen. Virol.** 79:381–384.

Meehan BM, Mcneilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **J. Gen. Virol.** 79:2171–2179.

Meng XJ (2013) Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** 1:43-64.

Nguyen VG, Do HQ, Huynh TM, Park YH, Park BK, Chung HC (2021) Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. **Transbound. Emerg. Dis.** 00:1–11.

Olvera A, Cortey M, Segales J (2007) Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. **Virology** 357:175–185.

Opriessnig T, Karuppannan AK, Castro A, Xiao CT (2020) Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus Res.**286:198044.

Opriessnig T, Xiao CT, Halbur PG, Gerber PF, Matzinger SR, Meng XJ (2017) A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naive pigs under experimental conditions. **Vaccine** 35:248–254.

Opriessnig T, Gerber PF, Xiao CT, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ (2014) Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. **Vaccine** 32:4342–4348.

Opriessnig T, O'Neill K, Gerber PF, de Castro AM, Giménez-Lirola LG, Beach NM, Zhou L, Meng XJ, Wang C, Halbur PG (2013a) 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** 31:487– 494.

Opriessnig T, Xiao C, Gerber PF, Halbur PG (2013b) Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. **Vet. Microbiol.** 163(1–2):177–83.

Opriessnig T, Patterson AR, Jones DE, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG (2009) Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to porcine circovirus-2 infection and associated lesions. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, 73:2.

Ouyang T, Liu XH, Ouyang HS, Ren LZ (2018) Mouse models of porcine circovirus 2 infection. **Anim. Models Exp. Med.**1:23–28.

Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM, McFadden G. A (2017) novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. **J. Virol.** 91:e01816–e01879.

Park C, Oh Y, Seo HW, Han K, Chae C (2013) Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model Clin. **Vaccine Immunol.** 20:369-376.

Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson T, Li L, Deng, X, Resende T, Vannucci F, Delwart E (2016) Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Viol. J.** 13:184.

Ren L, Chen X, Ouyang H (2016) Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. **Virus Genes.** 52:437-444.

Resende MG, Fux B, Caetano BC, Mendes EA, Silva NM, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RWA, Gazzinelli RT (2008) The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **An. Acad. Bras. Cienc.** 80.

Rose N, Andraud M, Bigault L, Jestin A, Grasland B (2016) A commercial PCV2a-based vaccine significantly reduces PCV2b transmission in experimental conditions. **Vaccine.**, 34:3738–3745.

Segalés, J (2015) Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. **Exp Rev Vacc.** 14(3):473–87.

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

Segalés J, Domingo M (2002) Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. **Veterinary Quarterly** 24:109-124..

Segalés J, Kekarainen T, Cortey M (2013) The natural history of Porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? **Vet. Microbiol.** 165:13-20.

Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S et al. (2008) PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Vet. Rec.** 162:867–868.

Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, et al. (2012) Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. **Vet Pathol.** 49:32-43.

Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park SJ, Chae C (2014) Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. **Arch. Virol.** 159:3107–3111.

Silva Junior, A (2005) **Circovirus suíno Tipo 2 (PCV2): caracterização molecular e construção de vetores para expressão da proteína do capsídeo**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Smith WJ, Thomson JR, Done S (1993) Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. **Vet. Rec.** 132:47.

Sorden SD (2000) Update on porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production.** 8(6):133-136.

Ssemadaali MA, Ilha M, Ramamoorthy S (2015) Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. **Res. Vet. Sci.** 103:179–186.

Stokes WS, Kulpa-Eddy J, McFarland R (2011) The International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing: introduction and summary, **Procedia in Vaccinology**, 5:1-15.

Sunagar R, Kumar S, Namjoshi P, Rosa SJ, Hazlett KRO, Gosselin EJ (2018) Evaluation of an outbred mouse model for *Francisella tularensis* vaccine development and testing. **PLoS One.** 11;13(12):e0207587.

Sylla S, Cong YL, Sun YX, Yang GL, Ding XM, Yang ZQ, Zhou YL, Yang MN, Wang CF, Ding Z (2014) Protective immunity conferred by porcine circovirus 2 ORF2-based DNA vaccine in mice. **Microbiol. Immunol.** 58:398–408.

Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W (1986) Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, 91(3-4):271-276.

Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature** 295:64–66.

Tischer I, Rasch R, Tochtermann G (1974) Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl. Bakteriол. Orig. A** 226:153–167.

Tuttle AH, Philip VM, Chesler EJ, Mogil JS (2018) Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. **Nat. Methods** 15:994–996.

Wang X, Jiang W, Jiang P, Li Y, Feng Z, Xu J (2006) Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. **Vaccine** 24(16):3374-80.

Wang X, Chen L, Yuan W et al. (2017) Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) on the function of splenic CD11c+ dendritic cells in mice. **Arch. Virol.** 162:1289-1298.

Wang Y, Noll L, Lu N, Porter E, Stoy C, Zheng W, Liu X, Peddireddi L, Niederwerder M, Bai J (2020) 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.** 67:1284–1294.

Watanabe H, Kousuke N, Takaaki I, Katsumasa T, Akihiro M (2004) "Innate immune response in Th1-and Th2-dominant mouse strains." **Shock** 22.5:460-466.

Xiao CT.; Halbur PG.; Opriessnig T (2015) 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. **J. Gen. Virol.**, 96:1830–1841.

Zhai SL et al. (2019) Reservoirs of porcine circoviruses: a mini review. **Front. Vet. Sci.** 6:319.

Zhang C, Zhu S, Wei L, et al. (2015) Recombinant flagellin-porcine circovirus type 2 cap fusion protein promotes protective immune responses in Mice. **PLoS ONE**.10:e0129617.

Zhang G, Jia P, Cheng G, et al. (2017) Enhanced immune response to inactivated porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine by conjugation of chitosan oligosaccharides. **Carbohydr. Polym.** 166:64-72.

Zhang HH, Hu WQ, Li JY, Liu TN, Zhou JY, Opriessnig T, Xiao CT (2020) Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. **Transbound. Emerg. Dis.** 67(3):1057-1061.

Zhu X, Liu J, Bai J, et al. (2016) Baculovirus expression of the N-terminus of porcine heat shock protein Gp96 improves the immunogenicity of recombinant PCV2 capsid protein. **J. Virol. Methods.** 230:36-44.