

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUANTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO E SUA
CORRELAÇÃO COM O GANHO DE PESO DE LEITÕES**

TAÍS FUKUTA DA CRUZ

BOTUCATU – SP
Junho 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUANTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO E SUA
CORRELAÇÃO COM O GANHO DE PESO DE LEITÕES**

TAÍS FUKUTA DA CRUZ

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

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

Dedicatória

*Aos meus avós **Mioki Fukuta e**
Alexandre Lopes da Cruz, com muito
amor e saudade.*

Agradecimentos

*A **Deus**, pela caminhada constante, por me confortar e fazer acreditar que a verdade dentro do coração é o nosso melhor guia em cada etapa da nossa vida.*

*Ao meu pai **Norberto**, minha mãe **Lena**, meus irmãos **Norberto** e **Paulo André** e minhas irmãs **Munirah** e **Mariane**. Muito obrigada pelo amor, apoio e compreensão de todos vocês! Eu também sinto muitas saudades!*

*Aos meus fiéis companheiros, os únicos que seguem os meus passos, **Idéiafix** e **Biba**.*

*À tia **Célia**, tia **Mirtis**, **Fafá**, tio **Tunca** e os meus primos **Thiago**, **Lucas** e **Matheus**. Apesar do longo tempo sem nos encontrarmos, eu sempre lembro de vocês e agradeço pela preocupação e carinho que sentem por mim.*

*Ao meu orientador **Prof. João Pessoa Araújo Junior**, agradeço pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Virologia/Diagnóstico Molecular e por tudo o que pude conhecer e aprender nesse período do mestrado. Muito obrigada, **chefe**, pela possibilidade de trabalhar em um ambiente descontraído, por toda a atenção, exigência, incentivo e compreensão que você teve comigo nos momentos mais difíceis do mestrado.*

*Ao **Rogério** e à **Cristiane**, pela amizade, sugestões e imensa ajuda para conseguir encontrar uma granja para a realização do estudo. Ao **Antônio Sérgio** (proprietário da granja) por permitir o acompanhamento e colheita de amostras dos leitões durante cinco meses, sempre com muita atenção e respeito e ao **Valdemar** (funcionário), pela paciência e disponibilidade em ajudar nas colheitas. Sem a participação de cada um esse trabalho não teria sido feito. Muito obrigada por tudo e pelo esforço para nos ajudar.*

*À **Márcia Furlan**, pela ajuda nas correções do trabalho, pelos conselhos e toda a preocupação de “mãe” que você teve por mim nesse período. Muito obrigada pela confiança e oportunidade de trabalharmos juntas nesse pouco tempo de convivência.*

Ao Prof. João Manuel Grisi Candeias agradeço pela atenção e por todas as vezes que você pode me ajudar, mesmo que fosse com coisas simples, mas que não deixavam de ser muito importantes para mim.

*Aos meus amigos do Laboratório de Virologia/Diagnóstico Molecular, **Thiago, Smurf, Gyrraya, Zé Augusto, Flávio, Prepúcio, Jossimara, Andreza, Telma, Andrea, Marcela, Michelle, Carol e Aline.** Muito obrigada pela convivência descontraída, pela alegria presente no laboratório e pela ajuda de todos nas colheitas dos leitões. Em muitos momentos de dificuldade, como aqueles em que “só o NO funcionou”, a presença de vocês fazia com que as coisas mais complicadas e impossíveis de serem alcançadas, se tornassem as mais simples, fáceis e até engraçadas de serem conseguidas. Desse jeito, sem ao menos muitos de vocês nem terem a noção do que estavam fazendo, ajudavam-me muito pela alegria que traziam para o laboratório.*

*Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente para o **Lula, Sônia e Nice.** Agradeço pela atenção, paciência e gentileza que vocês tiveram comigo.*

*Aos meus amigos da MI da veterinária, companheiros de residência e do mestrado, **Liguito, Rodrigo, André, Fábio, Amanda, Cristiane, Vanessa, Tatiana, Joel, Fábio Jundiaí, Leandro, Cris Brito, Daniel, Carla, Cláudio, Cleise e Liliane.** Enfim, mais uma etapa cumprida, ou melhor, mais uma página das nossas vidas virada, hein, Joel? Vocês se lembram daquela pergunta da residência? Agora ela serve para o mestrado: vocês acreditam na existência da vida após o mestrado??? Estou perto de saber a resposta!*

*Aos meus amigos da FCAV/UNESP/Jaboticabal, **Gisela, Mauro, Claudinha, Patrícia, Eveline, Anne Chen, Fernanda, Viviane Sakai e Juliana Midori,** muito obrigada pela amizade sincera e pela força que vocês me deram. Espero que a gente possa se encontrar mais vezes daqui para frente.*

*À minha amiga **Fabiana,** que para mim é um exemplo de coragem e ao **Prof. Célio Lemos,** que me mostrou a alegria que um estudo bem realizado pode trazer e pela enorme paciência em me ensinar.*

Ao Prof. Leonardo J. Richtzenhain e Alessandra M. M. G. Castro do VPS/FMVZ/USP pela ajuda para conseguirmos as culturas de células de suíno e as amostras positivas para o circovírus suíno.

À pesquisadora Janice Reis Ciacchi-Zanella, todos os funcionários do Laboratório de Virologia e aos amigos da Embrapa Suínos e Aves, pela troca de informações e ajuda técnica para a realização do isolamento viral do circovírus suíno.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu pela orientação e ajuda com o processamento de algumas amostras para isolamento bacteriológico.

À Profa. Renée L. Amorim e aos residentes do Serviço de Patologia Veterinária/FMVZ/UNESP/Botucatu que gentilmente processaram os materiais para exame histopatológico em um período de tempo bem curto.

Ao Prof. Dirlei Antonio Berto e Franco da FMVZ/UNESP/Botucatu por permitirem e ajudarem nas colheitas de amostras dos leitões do Setor de Suinocultura na Fazenda do Lageado.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 04/05301-0.

H de hora

*Há hora pra tudo, dizem,
e tudo tem sua hora
mas ninguém fez no relógio
a hora de não ter hora.*

Elza Beatriz

Resumo

Vários estudos têm demonstrado a associação entre a maior concentração viral do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) detectado por PCR quantitativa com o desenvolvimento de lesões microscópicas típicas da Síndrome da circovirose suína (SCS). Clinicamente, a SCS é caracterizada principalmente pelo emagrecimento progressivo, acompanhado de dispnéia, aumento de tamanho dos linfonodos, palidez e/ou icterícia das mucosas. A diminuição na taxa de crescimento dos leitões acometidos com a síndrome provoca grave prejuízo econômico para o produtor, o que torna a SCS uma das doenças mais importantes para a suinocultura. Assim, com o objetivo de comparar a concentração viral relativa do circovírus suíno (PCV) com o ganho de peso de leitões provenientes de uma granja comercial com SCS, amostras de sangue total, soro e “swab” nasal foram analisadas por PCR em tempo real com SYBR[®] Green I e PCR para o circovírus suíno tipo 1 (PCV1), sendo posteriormente, comparadas entre si para determinação de qual amostra seria mais apropriada para a utilização na PCR em tempo real com SYBR[®] Green I. Foram colhidas 128 amostras de sangue total, 128 de soro e 128 de “swab” nasal, as quais foram obtidas de 32 leitões acompanhados na maternidade, creche, recria e crescimento. Através da comparação das concentrações virais relativas do PCV entre as amostras, o sangue total mostrou-se mais apropriado para a PCR em tempo real, seguido do soro. Os “swabs” nasais não foram considerados apropriados para detecção do PCV pela técnica aplicada, pois o PCV detectado pode representar o vírus sendo eliminado nas secreções nasais e/ou uma contaminação do ambiente. Todas as amostras (n = 107) positivas para PCV por PCR em tempo real foram testadas para PCV1 e resultaram negativas. Analisando a comparação das concentrações virais de cada amostra com os pesos dos leitões, pode-se concluir que com o aumento da concentração viral relativa do PCV no sangue total ou soro, houve uma diminuição no ganho de peso e na relação entre os pesos dos leitões acompanhados no estudo.

Palavras-chave: síndrome da circovirose suína; PCV; PCV2; PCR em tempo real; ganho de peso; quantificação relativa.

Abstract

Several studies have shown the association among the largest viral concentration of Porcine circovirus type 2 (PCV2) detected by quantitative PCR with the development of typical microscopic lesions of Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Clinically, PMWS is characterized by the progressive weight loss, accompanied by dyspnea, enlargement of lymph nodes, paleness and/or jaundice of the mucous membranes. The reduced growth rate of the pigs affected with the PMWS causes serious economical damage, making this disease one of the most important for swine producing areas. Like this, with the objective of comparing the relative viral concentration of the PCV with the weight gain of piglets of a commercial farm with PMWS, samples of total blood, serum and nasal swab were analyzed by real time PCR using SYBR® Green I and PCR for the PCV1, and were compared later amongst themselves for determination of which sample would be more appropriate for quantitative PCR. A total of 128 samples of total blood, 128 of serum and 128 of nasal swab were collected, which were obtained from 32 piglets accompanied at the nursery, grower, and finisher stage. After analyses, total blood was shown more appropriate for real time PCR, followed by the serum. The nasal swabs were not considered appropriate for quantifications of PCV because detected PCV can represent the virus being eliminated in the nasal secretions and/or an environment contamination. All of the samples (n = 107) positive for PCV in real time PCR were also tested in PCR for PCV1 with negative results. The comparison between viral concentrations in blood or serum samples and the weights of the piglets, a negative correlation was observed.

Key word: Postweaning multisystemic wasting syndrome, PCV; PCV2; real time PCR; relative quantification, weight gain.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BLAST = *basic local alignment search tool*

Ct = *threshold cycle*

Δ Ct = delta Ct

ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*

GAPDH = *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

Hep-2 = *human epithelial cells*

Hela = *human epithelial cells*

IFI = imunofluorescência indireta

IHQ = imunoistoquímica

MEM = *minimum essential medium*

Nested-PCR = reação em cadeia pela polimerase interna

ORF = *open reading frame*

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia pela polimerase

PCV = circovírus suíno

PCV1 = circovírus suíno tipo 1

PCV2 = circovírus suíno tipo 2

PK-15 = células de rim de suíno

PPV = parvovírus suíno

PRRSV = vírus da Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos

Qa = quantificação absoluta

Qr = quantificação relativa

qsp = quantidade suficiente para

Rep = proteína de replicação

rRNA = RNA ribossomal

SCS = Síndrome da circovirose suína

SDS = *sequence detection systems*

SPF = *specific pathogen free*

SK-6 = células de rim de suíno

ST = células de testículo de suíno

TA = temperatura ambiente

TE = tampão Tris-HCl EDTA pH 8,0

Tm = *melting temperature*

Tth = *Thermus thermophilus*

Vero = células de rim de macaco verde africano

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	16
3. Objetivos	23
4. Material e Métodos	24
4.1. Descrição da granja comercial produtora de suínos e histórico da SCS	24
4.2. Delineamento experimental	25
4.3. Amostras biológicas	26
4.4. Controles	26
4.4.1. Controles positivos	26
4.4.2. Controle negativo	27
4.5. Extração do DNA das amostras colhidas e dos controles	27
4.6. PCR em tempo real para PCV com SYBR® Green I	27
4.7. DNA de referência na PCR em tempo real	28
4.8. Determinação da concentração relativa do PCV	28
4.9. PCR para PCV1	29
4.10. Processamento das amostras biológicas	29
4.11. Análise estatística	30
5. Resultados	31
5.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para PCV com SYBR® Green I	31
5.2. Peso dos leitões e exame dos linfonodos inguinais e mucosas	36
5.3. PCR em tempo real para PCV	36
5.4. PCR para PCV1	36
5.5. Amostras do ambiente	41
5.5.1. PCR em tempo real para PCV	41
5.5.2. PCR para PCV1	41
5.6. Comparação entre as amostras biológicas	43
5.7. Comparação entre a concentração viral relativa nas amostras analisadas e os pesos dos leitões	47
6. Discussão	54
7. Conclusões	60
8. Referências Bibliográficas	61
Glossário	68

1. Introdução

A Síndrome da circovirose suína (SCS) descrita recentemente no Canadá, por Harding em 1997, posteriormente foi associada com a presença do circovírus suíno tipo 2 (PCV2 – “Porcine circovirus type 2”). Esta síndrome acomete os leitões nas fases de creche e crescimento e tem como principal sinal clínico a progressiva perda de peso, juntamente com o aparecimento de dispnéia, aumento de tamanho dos linfonodos inguinais, diarréias, mucosas pálidas e/ou ictéricas.

A partir da sua descrição, a SCS está sendo relatada nos principais países produtores de suínos (Segalés & Domingo, 2002), contudo existe uma diferença na ocorrência dos sinais clínicos da SCS em leitões positivos para o PCV2 e na manutenção de um quadro subclínico e/ou aparentemente normal, em leitões também infectados com o PCV2 (Rodríguez-Arriola et al., 2000; Sibila et al., 2004).

Os prejuízos econômicos gerados pela SCS também são considerados de grande importância e preocupação para os suinocultores, devido à alta mortalidade em alguns surtos, descarte dos leitões acometidos gravemente e ao menor ganho de peso dos leitões que sobrevivem da doença. A essas perdas somam-se as dificuldades de prevenção e controle do PCV2 nas granjas diagnosticadas com a SCS e sem a síndrome, mas com animais infectados.

Essa diferença entre o surgimento da síndrome nos leitões e a infecção pelo PCV2 sem produção da doença clínica, além da participação de co-fatores para o desencadeamento da SCS, exige que o seu diagnóstico seja baseado em três critérios, definidos por Sorden (2000): (i) presença de sinais clínicos característicos, (ii) observação das lesões microscópicas em tecidos linfóides sugestivas da SCS e (iii) detecção de antígenos e/ou ácido nucléico do PCV2 no interior dessas lesões. Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas quantitativas, que propiciem uma associação entre os sinais clínicos e/ou lesões microscópicas características da SCS com a detecção do PCV2, está sendo realizado para auxiliar no diagnóstico da síndrome e nos estudos de patogenia e epidemiologia, sob condições experimentais e/ou de campo.

Em 2000, com o trabalho de Liu et al., adotando a técnica de PCR (Reação em cadeia pela polimerase) competitiva para quantificar o circovírus suíno tipo 1 (PCV1 – “Porcine circovirus type 1”), considerado não-patogênico e PCV2 em soros de suínos saudáveis e com SCS, sugeriu-se que o desenvolvimento da SCS pode necessitar de uma certa quantidade do PCV2. Posteriormente, outros estudos utilizando a PCR em tempo real demonstraram que os níveis de DNA do PCV2 detectados em vários tipos de amostras foram

mais elevados nos leitões com SCS do que nos suínos clinicamente saudáveis (Rovira et al., 2002; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Segalés et al., 2005).

A PCR em tempo real possibilita a quantificação da carga viral e pode ser realizada com diferentes sistemas de detecção fluorescente do ácido nucléico alvo. Recentemente, essa técnica está se tornando cada vez mais acessível e mostrando ser bastante rápida e segura, por evitar problemas de contaminação com produtos de amplificação (Klein, 2002).

A determinação da concentração do DNA alvo pode ser feita através da quantificação absoluta (Qa) ou relativa (Qr) (Livak & Schmittgen, 2001). Atualmente, a Qa é bastante utilizada no campo da virologia para determinação da carga viral (Niesters, 2001; Bustin & Mueller, 2005), entretanto a Qr também está sendo adotada nessa área (Li et al., 2006), demonstrando ser um método de fácil execução, o qual pode ser aplicado em diversos trabalhos, de acordo com os objetivos iniciais propostos.

Sendo o emagrecimento progressivo o principal sinal clínico da SCS, alguns estudos anteriores de infecção experimental de leitões inoculados somente com PCV2 para reprodução da SCS (Balasch et al., 1999; Albina et al., 2001) ou com a associação do PCV2 e parvovírus suíno (PPV – “Porcine parvovirus”) (Ostanello et al., 2005) demonstraram que houve uma redução na taxa de crescimento dos leitões inoculados com o PCV2.

Desta maneira, a carga viral do PCV2 quantificada através da PCR em tempo real pode ser associada com diversas variáveis, inclusive com o ganho de peso dos leitões, possibilitando uma melhor compreensão da SCS e suas diferentes formas de apresentação clínica.

2. Revisão de Literatura

O Circovírus Suíno (PCV – “Porcine circovirus”) foi identificado pela primeira vez por Tischer et al. em 1974, como um picornavírus que contaminava permanentemente culturas celulares de rim de suíno PK-15 (ATCC CCL 33).

Posteriormente, esse agente reconhecido como contaminante das culturas celulares foi denominado de Circovírus e observou-se que possuía um genoma de DNA de fita simples e circular (Tischer et al., 1982).

Em 1994, o PCV foi isolado de leitões recém-nascidos com tremores congênitos (tipo AII) por Hines & Lukert, apud por Lukert & Allan (2000). Em 1996, foi descrita a Síndrome da circovirose suína no Canadá (Harding, 1997) e o novo vírus envolvido nesta síndrome (PCV2), mostrou ser distinto antigênica e geneticamente do vírus contaminante de culturas celulares PK-15, denominado de PCV1 (Allan et al., 1998).

O PCV1 e PCV2 são vírus pequenos com aproximadamente 17 nm de diâmetro, de formato icosaédrico, não envelopados. Possuem um DNA de fita simples, com aproximadamente 1759 nucleotídeos, de polaridade negativa e com estrutura circular fechada covalentemente (Ellis & Allan, 2000). Pertencem à Família *Circoviridae*, Gênero *Circovirus* (Meehan et al., 1997).

Allan et al. (1994) estudando algumas características biológicas e físico-químicas do PCV1, verificaram que a densidade de flutuação em CsCl era de 1,33-1,34 g/cm³ e o coeficiente de sedimentação correspondia a 57 S. O PCV1 não possuía a propriedade hemaglutinante de eritrócitos de uma ampla variedade de espécies animais e era resistente à inativação quando exposto a um meio ácido (pH 3), clorofórmio ou temperaturas elevadas (56 e 70 °C). A susceptibilidade de culturas celulares à infecção por PCV1 também foi investigada. Após inoculação com o PCV1 e tratamento com a D-glucosamina, as culturas primárias, linhagens celulares semicontínuas e contínuas provenientes de bovinos, ovinos, aves, primatas (Vero) e humanos (Hep-2 e Hela) foram monitoradas pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e todas foram susceptíveis à infecção, exceto as culturas celulares aviárias. Contudo, somente as culturas celulares derivadas de suínos e de células Vero tiveram um aumento no número de células infectadas pelo PCV detectadas por IFI no citoplasma e núcleo a partir das passagens de células provenientes das culturas inoculadas. Poucos dados existem sobre as características do PCV2 e, mesmo não sendo demonstrado para este vírus, acredita-se que esses resultados observados para o PCV1, provavelmente sejam semelhantes para o PCV2 (Segalés & Domingo, 2002).

O PCV não produz efeito citopático detectável nos cultivos celulares. Recomenda-se o tratamento das células infectadas com 300 mM de D-glucosamina durante 30 minutos para a indução do ciclo celular, uma vez que o PCV depende das proteínas celulares expressas durante a fase S da mitose (Tischer et al., 1982). Porém, devido à natureza tóxica desse reagente, observa-se uma severa degeneração nas células infectadas e tratadas com D-glucosamina quando comparadas com as células infectadas e não-tratadas (Stevenson et al., 1999).

A sequência nucleotídica completa do PCV1 (1759 bases) já foi descrita (Mankertz et al., 1997; Meehan et al., 1997) e, em um estudo realizado por Hamel et al. (1998) comparando a sequência nucleotídica do PCV1 com a do PCV2, foi demonstrado que o PCV2 possui nove nucleotídeos a mais, totalizando 1768 bases. Os dois tipos de PCV possuem onze regiões de leitura aberta (ORF – “Open reading frame”). As proteínas codificadas pela ORF1 são semelhantes em peso molecular para o PCV1 e PCV2. Da mesma forma, isso também ocorre com as proteínas codificadas pela ORF2. As ORF3 a 10 do PCV2 são mais leves que a do PCV1, exceto para o ORF9 e 10, as quais são mais pesadas para o PCV2.

A ORF1 codifica a proteína de maior peso molecular (37 kDa), denominada proteína de replicação (Rep), não estrutural, mas essencial para a replicação viral. Essa região é bastante conservada entre PCV1 e PCV2, apresentando 83 % de semelhança nucleotídica e 86 % de similaridade na sequência de aminoácidos (Mankertz et al., 1997; Meehan et al., 1997).

Nawagitgul et al. (2000) verificaram que a ORF2 codifica uma proteína de 30 kDa, envolvida na formação do capsídeo viral. Neste estudo foram detectados anticorpos contra a proteína ORF2 em suínos infectados experimentalmente com PCV2 até 21 dias após inoculação, indicando que essa proteína, por estar localizada na superfície viral, tem um grande potencial para ser utilizada na detecção de PCV2 em suínos infectados e na produção de vacinas.

Há uma alta porcentagem de animais infectados com o PCV em todo o mundo, principalmente o PCV2, contudo mesmo na presença do PCV2, outros fatores desconhecidos são necessários para que um leitão infectado com este agente desenvolva a SCS ou permaneça com um quadro clínico aparentemente normal (Rodriguez-Arrioja et al., 2000; Sibila et al., 2004).

Em 2000, a SCS foi relatada pela primeira vez na região Sul do Brasil por Ciacchi-Zanella & Mores. A partir disso, casos naturais da SCS já foram descritos (Corrêa et al.,

2006) e um estudo de infecção experimental com PCV2 e PPV foi desenvolvido (Fernandes et al., 2006). A detecção do PCV1 e PCV2 por PCR em fetos mumificados e em leitões mortos com histórico de infecção respiratória, emagrecimento e refugagem também foi realizada (Castro et al., 2004), entretanto não há dados sobre a prevalência da SCS ou da infecção por PCV no nosso meio. Em um estudo retrospectivo realizado por Ciacchi-Zanella et al. (2004), com materiais de arquivo de 1988 e que possuíam lesões microscópicas sugestivas da SCS, o PCV2 foi detectado através da técnica de nested-PCR (Reação em cadeia pela polimerase interna) nesses materiais, demonstrando que a infecção por esse agente já estava presente no Brasil desde 1988.

Antígenos do PCV2 também estão sendo encontrados em associação com as lesões de pneumonia proliferativa e necrosante, em falhas reprodutivas e/ou abortamentos em porcas e na Síndrome da dermatite e nefropatia suína (Allan & Ellis, 2000).

O PCV1 é considerado não patogênico. Infecções experimentais de leitões falharam em demonstrar sinais clínicos e/ou lesões macroscópicas causadas pelo PCV1 (Allan et al., 1995; Krakowka et al., 2000).

Em 2004, Segalés et al. sugeriram que a patogenia da infecção pelo PCV2 em leitões na creche e crescimento ocorreria, inicialmente com a replicação do PCV2, provavelmente, nos macrófagos e células apresentadoras de antígenos nos tecidos linfóides, como as amígdalas e os linfonodos regionais (Clark, 1997; Rosell et al., 1999), ou alternativamente, nas placas de Peyer (Rosell et al., 1999). Após a infecção e replicação nessas células, o PCV2 poderia ser transportado intracelularmente ou livre nos linfonodos e/ou sangue. O trânsito normal das células-alvo com PCV2 para muitos tecidos poderia contribuir para a disseminação da infecção viral para vários órgãos (Rosell et al., 1999). Embora o mecanismo pelo qual a infiltração de histiócitos ocorra nos tecidos seja desconhecido, parece que essa infiltração é um dos eventos iniciais durante a infecção com o PCV2 e coincide com linfadenopatia macroscópica (Clark, 1997; Rosell et al., 1999). Lesões suaves a moderadas de SCS podem ser observadas em leitões clinicamente normais (Quintana et al., 2001), indicando que a infecção subclínica em leitões frequentemente ocorre em granjas afetadas pela SCS e não-afetadas (Rodríguez-Arrioja et al., 2000).

No entanto, apesar de todas as informações já levantadas, estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da patogenia do PCV1 e PCV2 associado às diferentes manifestações clínicas, particularmente com relação à identificação de co-fatores infecciosos ou não-infecciosos, além da determinação dos eventos iniciais na infecção com o PCV2.

A SCS afeta freqüentemente suínos entre cinco a 12 semanas de idade e, raramente, leitões lactentes (Allan & Ellis, 2000). Os sinais clínicos incluem perda de peso, emaciação, taquipnéia, dispnéia, icterícia, linfadenopatia e diarreia (Harding, 1997). Microscopicamente, os achados mais comuns são: diminuição do tecido linfóide e/ou inflamação linfocítica-histiocitária a granulomatosa nos órgãos (tipicamente no pulmão e/ou tecidos linfóides e com menor freqüência, no fígado, rim, pâncreas e intestino) (Sorden, 2000).

De acordo com Sorden (2000), o diagnóstico da SCS deve ser baseado em três critérios: presença de sinais clínicos compatíveis, de lesões histopatológicas características nos tecidos linfóides e de antígeno do PCV2 ou ácido nucléico no interior destes tecidos com lesões características.

O diagnóstico da infecção por PCV pode ser realizado mediante isolamento viral em culturas celulares de rim de suíno PK-15. Para tanto, amostras resfriadas de pulmão, amígdala, timo, baço, íleo, linfonodos, fígado e rim devem ser enviados para o laboratório. A presença do vírus pode ser detectada pelas técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase indireta (Lukert & Allan, 2000; Sorden, 2000). Contudo, células PK-15 (ATCC CCL 33) são persistentemente infectadas com PCV1, sendo necessário o uso de culturas celulares de PK-15 não infectadas com esse vírus, células Vero, SK-6 (rim de suíno) ou ST (testículo de suíno) para o isolamento viral.

Devido às dificuldades associadas com o isolamento de PCV1 e PCV2 em culturas de células, tem-se priorizado estudos conduzidos com métodos diagnósticos que detectam antígenos ou DNA viral (Allan & Ellis, 2001).

A hibridização “in situ” e imunoistoquímica são muito utilizadas com propósitos de pesquisa e no diagnóstico da SCS, por possibilitarem a associação entre o ácido nucléico ou antígeno do PCV2 detectado com a severidade das lesões microscópicas observadas nos tecidos linfóides (Rosell et al., 1999; Quintana et al, 2001).

A PCR é uma técnica que permite a detecção de um fragmento específico do DNA do PCV, a partir de diversas amostras, como sangue total, soro, secreções orofaríngeas e nasais, fezes, sêmen e de tecidos fixados em formol, processados pela técnica de inclusão em parafina (Kim et al., 2001; Kim & Chae, 2001; Shibata et al., 2003), possibilitando o aproveitamento de material fixado anteriormente para estudos retrospectivos. O uso de vários tipos de amostras também possibilita a adoção da PCR para caracterizar as vias de eliminação do PCV nos animais infectados (Segalés & Domingo, 2002).

O desenvolvimento de técnicas quantitativas, como a PCR em tempo real, pode auxiliar no diagnóstico da doença in vivo, pois se observou que a quantidade de PCV2 é muito mais alta nos leitões acometidos pela SCS do que nos animais infectados subcl clinicamente (Rovira et al., 2002; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Segalés et al., 2005).

Rovira et al. (2002) utilizaram pela primeira vez o método do “TaqMan” na PCR em tempo real para PCV2 em um estudo de infecção experimental com este agente e o vírus da Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV – “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus”). Pela PCR em tempo real a carga viral do PCV2 no soro foi mais alta nos suínos inoculados com PRRSV e PCV2 ($2,9 \times 10^6 - 1,1 \times 10^9$ cópias/mL) do que nos suínos inoculados somente com PCV2 ($4,2 \times 10^4 - 2,2 \times 10^6$ cópias/mL). Neste trabalho também foi avaliado o ganho de peso dos leitões inoculados e do grupo controle, entretanto, nenhuma associação entre a concentração viral com o ganho de peso foi realizada. De acordo com os autores, não houve diferença significativa no ganho de peso dos leitões inoculados somente com PCV2, quando comparados com os outros grupos testados no experimento.

De acordo com Olvera et al. (2004), a PCR em tempo real utilizando o sistema “TaqMan” para detecção do PCV2 no soro, pode ser utilizada para diferenciar a SCS de uma infecção subclínica causada pelo PCV2, propondo até um limiar de $>10^7$ genoma do PCV2/mL de soro como indicativo de lesões da SCS. Entretanto, um grande número de animais deve ser analisado para confirmar a carga viral do PCV2 necessária para diagnosticar a SCS em um grupo de animais.

O estudo realizado por Segalés et al. (2005), adotando o sistema do “TaqMan” na PCR em tempo real para detecção do PCV2 no soro, em “swabs” nasais, de amígdalas, traqueo-bronquiais, urinários e fecais de leitões acometidos pela SCS e sem SCS, também reforçou a sugestão anterior de 10^7 genoma do PCV2/mL no soro, sendo o PCV2 eliminado pelas secreções respiratórias (nasal e traqueo-bronquial) e oral (amígdalas), urina e fezes dos leitões afetados pela SCS e não-afetados, com alta concentração viral associada com a presença de lesões da SCS.

A detecção de anticorpos no soro sanguíneo de suínos para PCV1 e PCV2 pode ser realizada pelo teste de imunofluorescência indireta (Dulac & Afshar, 1989; Tischer et al., 1995; Allan et al., 1999), imunoperoxidase em monocamada (Rodriguez-Arrioja et al., 2000; Dulac & Afshar, 1989) e ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”) (Tischer et al., 1995; Walker et al., 2000; Nawagitgul et al., 2002; Blanchard et al., 2003). Uma vez que anticorpos anti-PCV2 podem ser encontrados em animais sem sinais clínicos da SCS, a

utilização de técnicas sorológicas para confirmar o diagnóstico da SCS em uma granja, pode ser muito difícil (Rodriguez-Arrioja et al., 2000).

Uma vez que a síndrome causada pelo PCV2 em suínos vem sendo reportada no Brasil, torna-se necessário o desenvolvimento e a padronização de métodos diagnósticos que possibilitem a aquisição de um melhor conhecimento desta doença, visando à adoção de medida de prevenção e controle compatíveis com as características das nossas criações.

Como o sinal clínico predominante na SCS é o emagrecimento progressivo, até mesmo os leitões que sobrevivem da síndrome apresentam falhas no crescimento, exibindo um menor ganho de peso, o qual resulta em prejuízos econômicos para o produtor (Krakowka et al., 2000). Estudos anteriores já relataram uma redução na taxa de crescimento em animais infectados experimentalmente com PCV2, apresentando sinais clínicos e lesões microscópicas suaves da SCS (Balasch et al., 1999; Albina et al., 2001). Posteriormente, Ostanello et al. (2005) sugeriram que a infecção ativa causada pelo PCV2 pode afetar o ganho de peso dos leitões, mesmo na ausência de sinais clínicos ou lesões macroscópicas características da SCS. Assim, como a presença de infecções subclínicas com PCV2 parece ser freqüente nas granjas produtoras de suínos (Segalés & Domingo, 2002), estudos adicionais devem ser desenvolvidos para avaliar os efeitos destas infecções sobre o desempenho dos animais.

Atualmente, a PCR em tempo real está se tornando uma técnica cada vez mais acessível, a qual permite a detecção direta do produto da PCR na fase exponencial da reação, por combinar amplificação e detecção em um único passo (Giulietti et al., 2001). A quantificação do gene alvo pode ser feita através da quantificação absoluta ou relativa (Livak & Schmittgen, 2001). A quantificação absoluta fornece o exato número de cópias do ácido nucléico alvo em uma amostra, contudo exige a produção de um DNA padrão para se obter esse resultado, o qual é calculado a partir do método da curva padrão (Giulietti et al., 2001). Em estudos objetivando a determinação da carga viral, a quantificação absoluta é muito utilizada, possuindo como principal vantagem o fato de trabalhar com unidades, as quais favorecem a compreensão e utilização de um resultado por vários profissionais (Mackay et al., 2002; Watzinger et al., 2006). Como o DNA padrão freqüentemente é plasmidial, ele pode ser produzido em grande quantidade, o que possibilita o seu uso durante longos períodos e facilita a adoção de um DNA como padrão em vários estudos. Porém, o custo para a sua produção é mais elevado e também são necessários alguns cuidados durante a sua manipulação para se evitar problemas de contaminação no laboratório.

A quantificação relativa descreve as mudanças na expressão de um gene alvo relativa a uma amostra de referência (Livak & Schmittgen, 2001), sendo um procedimento

mais simples de ser executado, com menor custo e que, de acordo com os objetivos de um estudo, fornece um resultado mais próximo das condições do experimento, uma vez que todas as comparações são realizadas com base em uma amostra de referência utilizada no próprio experimento. Para o cálculo da concentração relativa do gene alvo podem ser adotados os métodos da curva padrão ou comparativo Ct (“threshold cycle”) (Livak & Schmittgen, 2001), porém, esses resultados não serão expressos em unidades, como ocorre na quantificação absoluta (Mackay et al., 2002; Watzinger et al., 2006).

Recentemente, para a determinação da concentração viral, a quantificação relativa foi utilizada em um estudo com o vírus da Doença de Gumboro (Li et al., 2006), demonstrando ser uma alternativa favorável para pesquisas de quantificação viral com a adoção da PCR em tempo real.

Diante do exposto, a aplicação desta técnica associada com outros métodos de detecção do ácido nucléico, como SYBR[®] Green I, justifica a realização do presente estudo para a verificação de amostras apropriadas para a prova, obtidas de animais vivos, permitindo posteriormente a comparação da concentração viral do PCV determinada com o peso dos animais acompanhados durante as fases de produção em uma granja comercial com SCS.

3. Objetivos

Adaptar e aplicar a PCR em tempo real com SYBR[®] Green I para determinar a concentração viral relativa do PCV nas amostras biológicas (sangue total, soro ou “swab” nasal) colhidas dos leitões no período entre a maternidade e o crescimento, provenientes de uma granja comercial com suspeita de SCS.

Determinar qual das amostras biológicas (sangue total, soro ou “swab” nasal) colhidas dos leitões é mais apropriada para a utilização na PCR em tempo real com SYBR[®] Green I.

Correlacionar a carga viral do PCV, quantificada na PCR em tempo real com SYBR[®] Green I, com o peso dos leitões obtidos no período entre a maternidade e o crescimento, provenientes de uma granja comercial com suspeita de SCS.

4. Material e Métodos

4.1. Descrição da granja comercial produtora de suínos e histórico da SCS

A granja de suínos, onde o estudo foi realizado, localiza-se no município de Socorro – SP (coordenadas S 22°31'04.8" W 046°27'48.3"). A área de produção dos suínos abrange 100.000 m², funciona com ciclo completo de produção e tem 200 matrizes.

O proprietário relatou que no início de janeiro de 2005 aconteceram os primeiros casos sugestivos de SCS. No primeiro episódio, os sinais clínicos foram discretos, contudo nos meses de abril e maio de 2005, os leitões apresentaram sinais mais severos de emagrecimento progressivo, pêlos arrepiados, diarreia nos primeiros dias e depois tosse. Os leitões acometidos foram principalmente os da fase de recria, entre 50 e 70 dias. Nesse surto, cerca de 20% dos leitões adoeceram e 10% foram a óbito. Posteriormente, foi diagnosticada a infecção pelo PCV2 através da técnica de PCR.

Para tentar controlar os casos, semanalmente, os leitões com suspeita de SCS eram colocados na baia dos doentes, tratados com antibiótico injetável e na ração. Nesta baia, os leitões que sobreviviam passavam para as outras fases separadamente até atingirem o peso de abate, conforme o seu ganho de peso. Também foram adotadas, como medidas para controle da doença, o uso de desinfetantes três vezes por dia na creche e maternidade e duas vezes por semana em toda a granja. A recomendação de misturar ao mínimo as leitegadas após o desmame foi adotada, no entanto, para os leitões com suspeita de SCS o quadro clínico agravou-se, uma vez que esses leitões juntamente com outros maiores, ficaram em desvantagem para se alimentarem e ingerirem água adequadamente e, assim, tornou-se a fazer a separação das leitegadas por tamanho. A idade de desmame aumentou pouco, passando de 20 – 21 dias para 21 – 25 dias. Para a reposição dos animais são utilizados leitões da própria granja e as porcas são descartadas em torno da sétima cria. Há seis anos que a inseminação artificial é realizada e quase não ocorrem problemas reprodutivos na granja.

Entre outubro de 2005 a janeiro de 2006, quando foram realizadas as colheitas, o rebanho apresentou sinais clínicos moderados sugestivos de SCS, segundo o relato do proprietário. Para se fazer o diagnóstico da SCS na granja, de acordo com os três critérios definidos por Sorden (2000), dois leitões com suspeita da SCS e separados na baia dos doentes foram necropsiados e colhidos fragmentos de órgãos (pulmão, baço, fígado, rim, linfonodos inguinais, mesentéricos e mediastínicos) para exame histopatológico e detecção do PCV2 por PCR. A associação das lesões microscópicas juntamente com a detecção do PCV2

nos tecidos linfóides indicou que os leitões estavam com a SCS e considerou-se que esses animais apresentavam uma forma suave da síndrome.

4.2. Delineamento experimental

Foram efetuadas quatro colheitas de amostras de sangue total e “swab” nasal de 34 leitões nascidos de cinco porcas selecionadas de acordo com a proximidade entre as datas de parto. Os leitões foram acompanhados nas fases de maternidade, creche, recria e crescimento, entre os meses de outubro de 2005 a janeiro de 2006. A colheita na maternidade foi identificada como dia zero. As próximas colheitas foram realizadas com 23, 41 e 86 dias após a da maternidade, nas fases de creche, recria e crescimento, respectivamente.

Todos os leitões foram identificados por marcação padrão nas orelhas e tratados conforme o manejo realizado na granja. Os leitões foram pesados, seus linfonodos inguinais examinados e observou-se a coloração das mucosas ocular e oral. Os linfonodos inguinais foram palpados e classificados como normal, discretamente aumentados (+), aumentados (++) ou muito aumentados (+++). A coloração das mucosas foi classificada em rósea, pálida ou ictérica.

A primeira colheita de amostras aconteceu em outubro de 2005, com os leitões na maternidade, dois dias antes da desmama. A segunda colheita ocorreu 20 dias após a entrada na creche, no mês de novembro de 2005, onde os 34 leitões estavam separados em duas baias. Na baia I estavam 25 leitões e, na baia II, nove leitões mais outros 16 que não estavam incluídos no experimento. A terceira colheita, em dezembro de 2005, foi efetuada na fase de recria, iniciada 11 dias antes. Nesta fase, os leitões de cada baia foram transferidos juntos, mantendo os mesmos grupos, para duas baias (I e II) da recria. Na recria, houve o óbito de um leitão na baia I (L27) e dois leitões (L23 da baia I e L31 da baia II) foram levados para a baia dos doentes por apresentarem sinais de emagrecimento (refugos do lote) e pêlos arrepiados. Na fase de crescimento foram separados mais três leitões (L25 da baia I, L26 da baia II e L34 da baia II) para a baia dos doentes e ocorreu mais um óbito (L31). Assim, nesta fase que iniciou aproximadamente 22 dias antes da última colheita, em janeiro de 2006, a baia I ficou com 25 leitões e a baia II, com três leitões. Entretanto, os leitões de cada baia foram agrupados de forma diferente dos grupos anteriores. Os leitões transferidos para a baia dos doentes também tiveram suas amostras colhidas durante o experimento. Deste modo, finalizaram-se as colheitas com 32 leitões e dois leitões (L27 e L31) foram a óbito. Adicionalmente, amostras do ambiente (“swabs”) foram colhidas do comedouro e bebedouro

da baia I dos leitões na fase de recria e também, do comedouro, bebedouro e da lâmina d'água da baia dos doentes, na colheita ocorrida na fase de recria.

4.3. Amostras biológicas

Cerca de 10 mL de sangue total foi colhido dos leitões por punção da veia jugular e/ou veia cava cranial. Os animais foram contidos manualmente e, para os leitões da fase de crescimento, utilizou-se o cachimbo para imobilizá-los. Uma fração (1,0 mL) do sangue total foi transferido para um tubo contendo 1,0 mL da solução de Alsever e o volume restante do sangue (9,0 mL) foi colocado em tubo de polipropileno de 15 mL para retração do coágulo e obtenção do soro. As secreções nasais foram colhidas profundamente em cada narina, utilizando um único “swab” com ponta de rayon (INLAB), friccionado na mucosa suavemente. Estes foram colocados em tubos de polipropileno de 15 mL contendo 1,0 mL de PBS (0,01 M PO_4^- 0,14 M NaCl pH 7,4). Os “swabs” do ambiente também foram armazenados da mesma forma realizada para os “swabs” nasais. Os três tipos de amostras foram conservados em gelo, durante o período de transporte até o laboratório.

No laboratório, o sangue total com coágulo retraído foi dessorado e clarificado a 2500 x g por 10 minutos a 4 °C e o soro obtido foi armazenado a -20 °C. As amostras de sangue em solução de Alsever foram guardadas a 4 °C e os “swabs” nasais e do ambiente foram mantidos a -70 °C, até o momento do uso.

4.4. Controles

4.4.1. Controles positivos

O controle positivo do PCV1 consistiu de sobrenadante e lisado de cultura de células PK-15 (ATCC CCL 33) persistentemente infectadas com PCV1. Para o PCV2 utilizou-se sobrenadante e lisado de cultura de células ST infectadas com este vírus. Para tanto as células foram inoculadas com um macerado de linfonodo inguinal a 10% em meio MEM (“Minimum essential medium” – Gibco BRL), do qual se obteve resultado positivo para PCV2 e negativo para PCV1 quando submetido a PCR realizada conforme descrito por Larochelle et al. (1999). As culturas de células PK-15 (ATCC CCL 33) persistentemente

infectadas e ST foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Universidade de São Paulo.

4.4.2. Controle negativo

Em todas as extrações e reações de PCR para PCV1 e PCR em tempo real para PCV foi utilizada como controle negativo a água ultrapura estéril.

4.5. Extração do DNA das amostras colhidas e dos controles

O DNA foi extraído do sangue total, do soro e do “swab” com o kit GFXTM Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Para a extração de DNA do sangue total, o material foi homogeneizado no vortex e centrifugado a 1700 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram pipetados 50 µL do sobrenadante e 50 µL das células sangüíneas depositadas no fundo do tubo. Os “swabs” nasais e do ambiente, após congelamento (-70 °C) e descongelamento em TA, foram homogeneizados no vortex e centrifugados a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Nesse material e no soro, as extrações foram executadas de acordo com o método direto recomendado pelo fabricante, utilizando 100 µL de cada amostra biológica. Para todos os casos, o DNA foi eluído da coluna do kit com 100 µL de água ultrapura estéril. O mesmo protocolo de extração do DNA foi adotado para os controles positivo e negativo.

4.6. PCR em tempo real para PCV com SYBR® Green I

Foram empregados os “primers” “forward” (5’-GAT GAT CTA CTG AGA CTG TGT GA) e “reverse” (5’-AGA GCT TCT ACA GCT GGG ACA) para amplificarem um produto de 152 pb (pares de bases) da região ORF1, conservada entre o PCV1 e PCV2 (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002).

A reação foi desenvolvida com o uso do kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, em um volume de 20 µL com a adição de 5 µL da amostra por reação. As condições da reação foram: 50 °C / 2 minutos, 95 °C / 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C / 1 minuto, 60 °C / 1 minuto e 72 °C / 1 minuto seguidos de uma curva de dissociação de 95 °C a 60 °C. O aparelho de PCR em tempo real

utilizado foi o 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os sinais de fluorescência foram adquiridos nos passos de extensão do ciclo de amplificação. Todas as amostras foram processadas em duplicata.

4.7. DNA de referência na PCR em tempo real

O DNA de referência para o PCV2 consistiu de uma mistura de vários DNA do PCV2 extraídos de suspensões de linfonodo, rim, fígado e baço a 10 % em TE, com DNAzol[®] (Gibco BRL) segundo as recomendações do fabricante e de DNA extraídos de soros. Estas amostras de órgãos e soros foram obtidas de leitões com sinais clínicos sugestivos de SCS criados na própria granja acompanhada nesse estudo e com resultados prévios positivos para PCV2 e negativos para PCV1. Esse DNA foi diluído de 1:2 a 1:128 em água ultrapura estéril e estas diluições foram testadas, em triplicatas, na PCR em tempo real para PCV, conforme foi detalhado no item 4.6. Pela determinação do “baseline” e “threshold” e análise da curva de dissociação (T_m – “melting temperature”), dos C_t (“threshold cycle”) produzidos por cada diluição e da curva padrão fornecida pelo programa SDS versão 1.2.3 (“Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems). As quatro diluições que apresentaram C_t entre os ciclos 25 a 30 foram escolhidas para serem usadas em todas as reações e servirem como referência na quantificação relativa da carga viral do PCV.

4.8. Determinação da concentração relativa do PCV

Para a quantificação relativa do PCV nos três tipos de amostras biológicas provenientes dos leitões, utilizou-se a curva padrão calculada com quatro pontos.

A menor diluição do DNA de referência recebeu o valor relativo igual a 1,0 e, seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições do DNA foram determinadas como 0,5; 0,25 e 0,125.

Em cada placa de reação, uma curva padrão usando essas quatro diluições foi construída para a realização da quantificação relativa da carga viral do PCV nas amostras de sangue total, soro ou “swab” nasal dos leitões processadas na PCR em tempo real para PCV e dos “swabs” obtidos do ambiente.

A concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa SDS 1.2.3, calculada em relação à curva padrão e ao valor igual a um, estabelecido para o DNA de referência.

4.9. PCR para PCV1

Na PCR para o PCV1 foi utilizado o par de “primers” PF2 (5'-TTG CTG AGC CTA GCG ACA CC-3') e PR2 (5'-TCC ACT GCT TCA AAT CGG CC-3') que amplificaram um produto de 349 pb da região ORF1 específica para o PCV1 (Larochelle et al., 1999).

A reação foi preparada em um volume de 25 µl contendo 75 mM de Tris-HCl pH 9; 2 mM de MgCl₂; 50 mM de KCl; 20 mM de (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada “primer”; 1,0 U da *Tth* DNA polimerase (Biotools B&M Labs); 5,0 µL do DNA extraído e água ultrapura estéril qsp. As condições da reação foram 94 °C / 10 minutos, 39 ciclos de 94 °C / 60 segundos, 60 °C / 60 segundos e 72 °C / 60 segundos com um passo de extensão final de 72 °C / 10 minutos.

O produto amplificado foi visualizado após eletroforese com gel de agarose a 1,5% corado com 0,1 % de brometo de etídeo a 20 mg/mL. O marcador de 100 pb foi utilizado como marcador de DNA.

4.10. Processamento das amostras biológicas

Todas as amostras de sangue total (n = 133), soro (n = 133) e “swab” nasal (n = 133) foram processadas, inicialmente, através da PCR em tempo real para PCV. As três amostras biológicas dos leitões que apresentaram resultados positivos para PCV, foram testadas na PCR para PCV1.

Os “swabs” (n = 5) obtidos do ambiente foram testados na PCR em tempo real para PCV e PCR para PCV1.

4.11. Análise estatística

As concentrações virais relativas do PCV encontradas nas amostras biológicas (sangue total, soro e “swab” nasal) colhidas dos leitões foram correlacionadas entre si, através da análise de regressão, com um nível de confiança de 95 %.

A somatória das cargas virais relativas do PCV determinadas nas quatro colheitas para cada amostra (sangue total, soro ou “swab” nasal) obtidas dos leitões, foi correlacionada com o ganho de peso destes animais entre a primeira e quarta colheita ou com a relação dos pesos entre a quarta e primeira colheita através da análise de regressão, com um nível de confiança de 95%. O resultado da análise de regressão foi denotado como perfeita ($r = 1,0$), forte ($r > 0,75$), média ($r > 0,5$), fraca ($r < 0,5$) e inexistente ($r = 0$) (Doria Filho, 2001).

Em todas as análises realizadas, os dois leitões que foram a óbito (L27 e L31), não foram considerados nessas comparações, sendo utilizados 32 leitões, dos quais se obteve 128 amostras para sangue total, 128 amostras para soro e 128 amostras para “swab” nasal.

5. Resultados

5.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para PCV com SYBR[®] Green I

As diluições do DNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da carga viral do PCV estão na Tabela 1. Para isso, foram selecionadas quatro diluições (1:16, 1:32, 1:64 e 1:128), com o “threshold” determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Tabela 1: Valor relativo, $\log_{10}$ do valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do DNA referência obtidos pela PCR em tempo real para PCV

DNA Referência	Valor relativo	$\log_{10}$ valor relativo	Média Ct	Desvio-padrão dos Ct
Puro	16,0	1,2	19,52	0,077
1:2	8,0	0,9	20,52	0,065
1:4	4,0	0,6	21,60	0,131
1:8	2,0	0,3	23,50	0,048
1:16	1,0	0,0	25,37	0,041
1:32	0,5	- 0,3	26,63	0,051
1:64	0,25	- 0,6	28,20	0,099
1:128	0,125	- 0,9	29,86	0,031

O gráfico da curva de amplificação está apresentado na Figura 1. A análise da curva de dissociação encontra-se na Figura 2 e pode-se observar a formação de um pico único, com a T_m entre 80,80 °C a 81,10 °C. Na Figura 3 encontra-se a demonstração gráfica da curva padrão obtida com as diluições do DNA de referência. Obteve-se coeficiente de correlação (r) igual a 0,997 entre os valores de Ct e a concentração do DNA de referência. Na Figura 4 está apresentada a curva padrão, apenas com as quatro diluições selecionadas. O coeficiente de correlação (r) foi de 0,998.

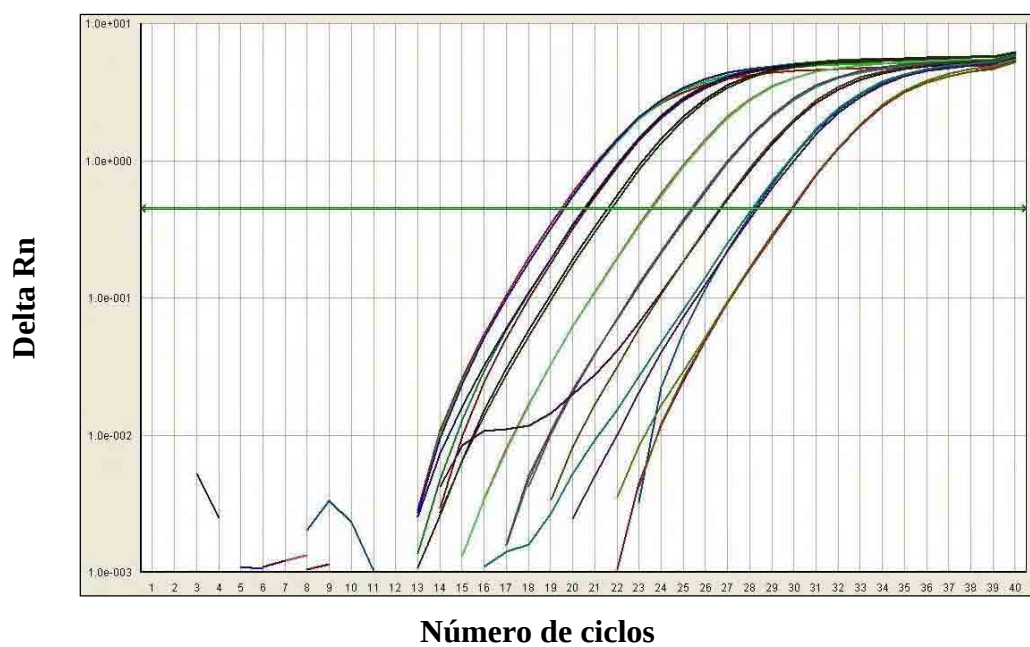


Figura 1: Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para PCV das diluições do DNA de referência desde puro até 1:128, em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita

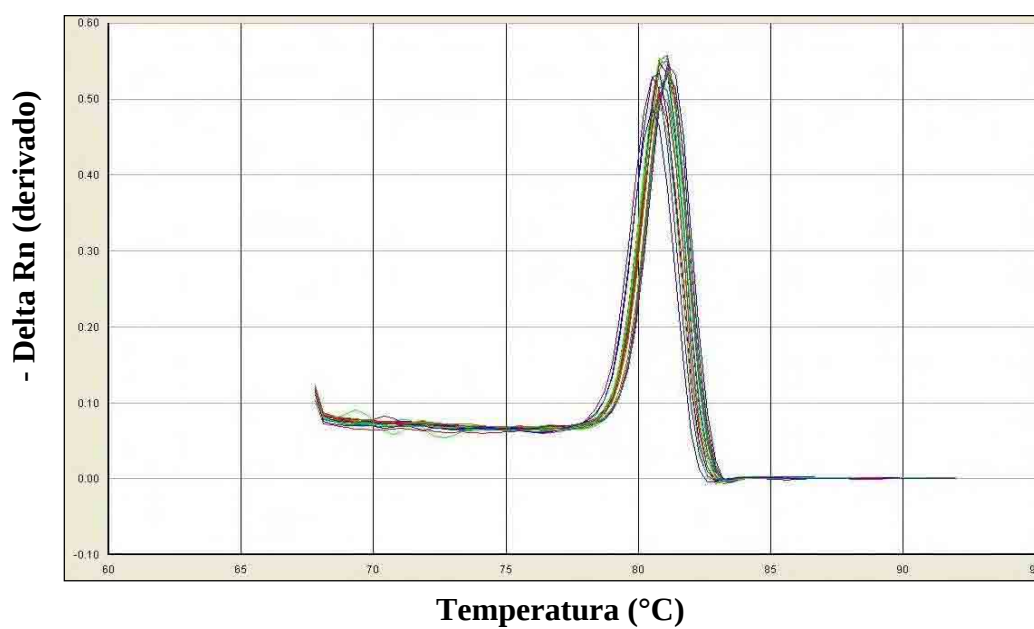


Figura 2: Gráfico da curva de dissociação obtida através da PCR em tempo real para PCV do DNA de referência desde puro até 1:128

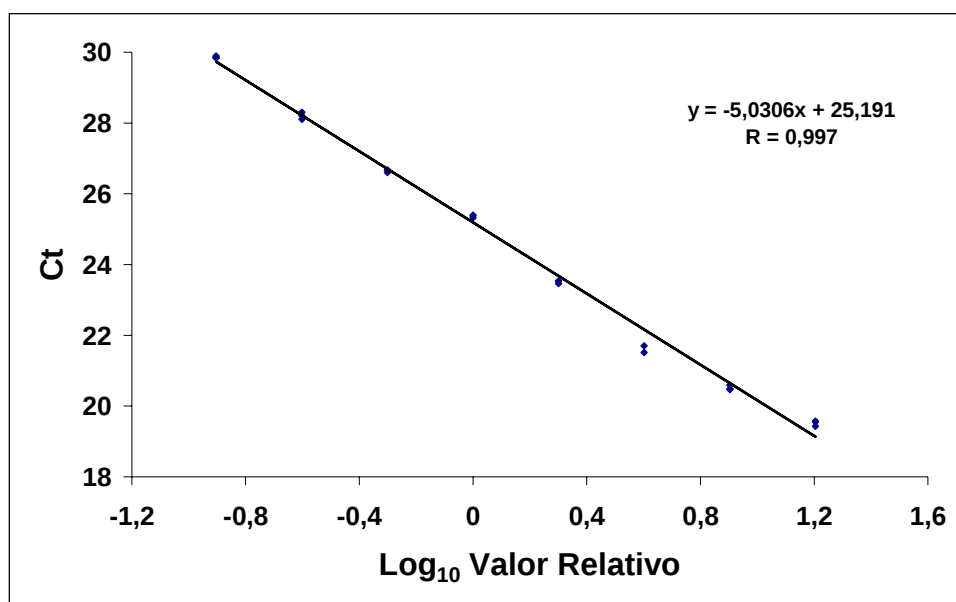


Figura 3: Gráfico da curva padrão construída com oito pontos (DNA de referência desde puro até 1:128) a partir da PCR em tempo real para PCV

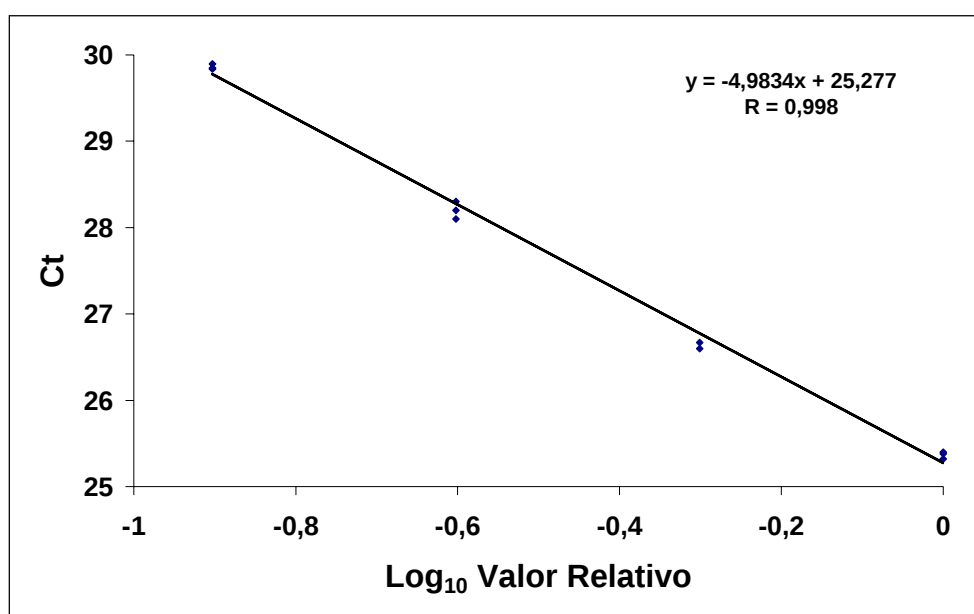


Figura 4: Gráfico da curva padrão construída com quatro pontos (DNA de referência diluído de 1:16 até 1:128) a partir da PCR em tempo real para PCV

5.2. Peso dos leitões e exame dos linfonodos inguinais e mucosas

No Quadro 1 estão apresentados o sexo, idade e tamanho dos linfonodos inguinais examinados nos leitões durante as quatro colheitas. Da mesma forma, no Quadro 2 estão descritos os pesos, o ganho de peso e a relação entre os pesos obtidos dos leitões nas quatro colheitas. Com exceção de um leitão (L28), na fase de crescimento que estava com a mucosa pálida, todos os outros nas quatro fases de produção estavam com as mucosas róseas.

5.3. PCR em tempo real para PCV

As cargas virais relativas para PCV de cada amostra biológica colhida dos leitões estão descritas no Quadro 2. Na análise deste quadro foi identificado o PCV em 107 amostras de um total de 399, considerando todas as colheitas, para os 34 leitões acompanhados no estudo. As porcentagens dos leitões positivos para cada tipo de amostra, obtidas nas quatro colheitas do total de 34 animais, estão demonstradas na Figura 5.

5.4. PCR para PCV1

Das 107 amostras onde foi identificado o PCV por PCR em tempo real, todas foram negativas para PCV1.

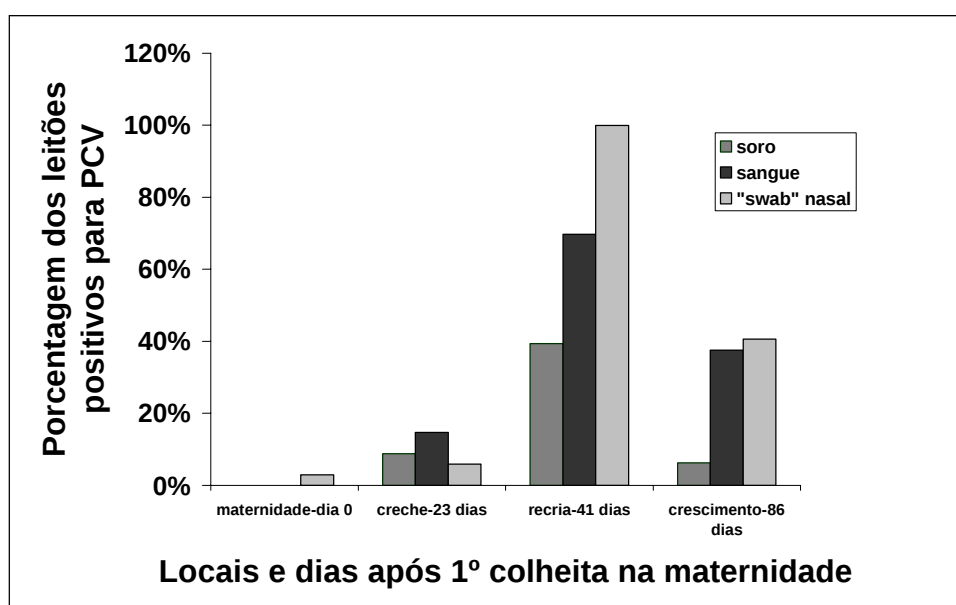


Figura 5. Porcentagem dos leitões positivos para PCV pela PCR em tempo real, por colheita e tipo de amostra

Quadro 1. Sexo, idade e tamanho dos linfonodos inguinais examinados nos leitões nas quatro colheitas

Leitão	Sexo	Porca	Parição	Idade (dias)				Linfonodo inguinal			
				1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col
L1	m	121	03/10/2005	22	46	64	91	normal	normal	+	
L2	f	121						normal	normal	normal	normal
L3	f	121						normal	normal	+	normal
L4	f	121						normal	normal	normal	normal
L5	f	121						normal	+	+	normal
L6	f	121						normal	normal	normal	normal
L7	m	121						+	normal	normal	normal
L8	f	891	04/10/2005	21	45	63	90	normal	normal	+	normal
L9	m	891						+	+	normal	++
L10	f	891						normal	normal	normal	normal
L11	m	891						+	normal	normal	normal
L12	f	891						normal	normal	normal	
L13	f	891						normal	+	normal	+
L14	m	891						normal	normal	normal	+
L15	m	891						normal	normal	normal	+
L16	f	891						normal	normal	normal	normal
L17	m	891						normal	++	+	normal
L18	m	891						+	normal	normal	normal
L19	m	891						normal	normal	normal	normal
L20	f	529	05/10/2005	20	44	62	89	normal	normal	+	normal
L21	f	529						normal	normal	+	normal
L22	f	529						normal	normal	normal	+
L23	m	529						+	normal	++	++
L24	f	529						normal	normal	+	normal
L25	f	529						normal	normal	+	++
L26	m	771	10/10/2005	15	39	57	84	+	+	normal	+++
L27	m	401	11/10/2005	14	38	56	83	normal	+	ÓBITO	ÓBITO
L28	f	401						+	+	+	++
L29	m	401						normal	+	+	++
L30	m	401						+	+	normal	normal
L31	m	401						normal	+	+	ÓBITO
L32	m	401						normal	++	normal	normal
L33	f	401						normal	+	+	normal
L34	f	401						normal	normal	normal	+

col = colheita, f = fêmea, m = macho, + = discretamente aumentado, ++ = aumentado, +++ = muito aumentado

Quadro 2. Concentrações virais relativas para PCV, peso (Kg), ganho de peso (Kg) e relação entre os pesos dos leitões

Leitão	Soro PCR em tempo real				Sangue PCR em tempo real				"Swab" nasal PCR em tempo real				Peso (Kg)				Ganho de peso (Kg)	Relação entre os pesos
	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col		
L1	-	-	0,019	-	-	-	0,209	-	-	-	0,369	0,173	9,1	21,0	32,5	77,0	67,9	8,5
L2	-	-	-	-	-	-	0,129	0,329	-	-	0,179	0,127	6,8	16,0	26,5	66,0	59,2	9,7
L3	-	-	-	-	-	-	0,153	-	-	-	0,844	0,119	8,0	17,5	27,0	72,0	64	9,0
L4	-	-	-	-	-	-	0,242	-	-	0,030	0,581	-	7,2	15,5	23,0	66,0	58,8	9,2
L5	-	-	0,044	-	-	-	0,612	-	-	-	0,687	0,117	6,6	17,0	28,5	71,0	64,4	10,8
L6	-	-	-	-	-	-	0,186	-	-	-	0,558	0,169	6,5	13,0	26,5	75,0	68,5	11,5
L7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,337	0,095	7,0	29,0	28,0	78,0	71	11,1
L8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,460	-	5,8	13,0	22,5	69,0	63,2	11,9
L9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,278	-	4,5	12,0	22,0	66,0	61,5	14,7
L10	-	-	-	-	-	-	-	0,147	-	-	0,114	0,065	6,0	14,0	23,0	64,0	58	10,7
L11	-	-	-	-	-	-	-	0,294	-	-	0,573	-	4,5	14,0	24,5	66,0	61,5	14,7
L12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,600	0,102	6,2	14,0	24,5	66,0	59,8	10,6
L13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,083	-	6,0	14,5	26,0	69,0	63	11,5
L14	-	-	-	-	-	-	-	0,212	-	-	0,377	-	6,5	16,5	28,0	68,0	61,5	10,5
L15	-	-	-	-	-	-	0,138	0,334	-	-	0,317	0,066	5,5	13,5	24,5	67,0	61,5	12,2
L16	-	-	-	-	-	-	0,142	-	-	-	1,040	-	5,9	13,0	20,5	60,0	54,1	10,2
L17	-	-	-	-	-	-	0,139	-	-	-	0,619	0,059	5,0	11,0	20,5	69,0	64	13,8
L18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,159	0,079	5,2	11,0	19,5	64,0	58,8	12,3
L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,076	-	7,0	17,0	28,0	71,0	64	10,1
L20	-	-	0,120	-	-	-	4,230	0,670	-	-	0,225	-	5,1	10,5	17,5	54,0	48,9	10,6
L21	-	-	0,085	-	-	-	3,560	0,460	-	-	0,621	-	7,0	13,0	21,0	59,0	52	8,4
L22	-	-	-	-	-	-	1,180	0,211	-	-	0,414	0,054	6,2	13,5	21,0	56,0	49,8	9,0
L23	-	0,256	0,061	-	-	2,780	1,780	1,160	-	0,080	1,380	0,056	5,7	7,5	8,5	28,0	22,3	4,9
L24	-	-	0,063	-	-	0,023	1,440	0,196	-	-	0,152	-	6,5	12,0	19,5	55,0	48,5	8,5
L25	-	-	0,210	0,089	-	0,180	5,560	3,900	-	-	0,633	-	8,8	15,0	17,5	41,0	32,2	4,7
L26	-	-	0,077	-	-	-	1,790	-	-	-	0,334	-	4,1	9,0	17,5	51,0	46,9	12,4
L27	-	0,290	ÓBITO	ÓBITO	-	1,210	ÓBITO	ÓBITO	-	-	ÓBITO	ÓBITO	4,2	10,0	ÓBITO	ÓBITO	ÓBITO	ÓBITO
L28	-	-	0,258	-	-	-	3,980	1,000	-	-	0,912	-	5,0	14,0	21,5	51,0	46	10,2

Quadro 2. Concentrações virais relativas para PCV, peso (Kg), ganho de peso (Kg) e relação entre os pesos dos leitões (continuação)

Leitão	Soro PCR em tempo real				Sangue PCR em tempo real				“Swab” nasal PCR em tempo real				Peso (Kg)				Ganho de peso (Kg)	Relação entre os pesos
	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col	1 col	2 col	3 col	4 col		
L29	-	-	0,193	0,061	-	-	4,820	-	-	-	0,274	-	4,8	11,5	18,0	37,0	32,2	7,7
L30	-	-	-	-	-	-	0,569	-	0,083	-	0,046	-	5,8	11,5	22,0	68,0	62,2	11,7
L31	-	0,049	7,780	ÓBITO	-	0,190	43,620	ÓBITO	-	-	9,330	ÓBITO	5,5	10,5	11,5	ÓBITO	ÓBITO	ÓBITO
L32	-	-	-	-	-	-	0,627	-	-	-	0,134	-	6,1	13,5	24,0	64,0	57,9	10,5
L33	-	-	0,132	-	-	-	1,640	-	-	-	0,780	-	5,0	12,5	20,5	58,0	53	11,6
L34	-	-	0,045	-	-	-	1,020	-	-	-	0,325	-	5,1	10,5	19,0	56,0	50,9	11,0

col = colheita

5.5. Amostras do ambiente

5.5.1. PCR em tempo real para PCV

A carga viral relativa do PCV foi calculada para as amostras (“swab”) colhidas do ambiente e comparadas com a concentração viral relativa igual a um do DNA de referência, conforme está apresentado na Figura 6.

5.5.2. PCR para PCV1

Todas as amostras testadas foram negativas para PCV1.

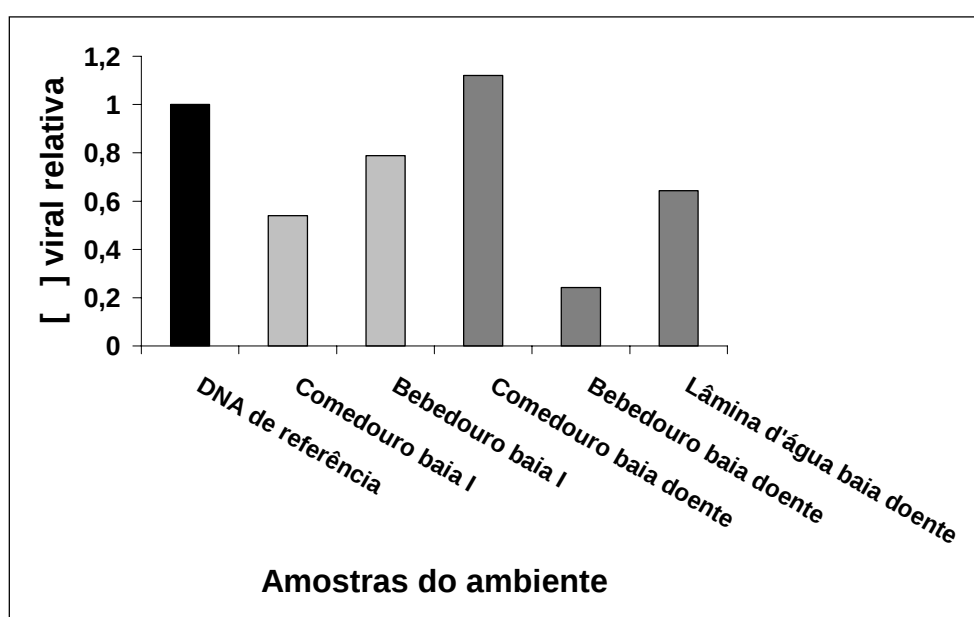


Figura 6: Cargas virais relativas do PCV nas amostras do ambiente e do DNA de referência estabelecido com a concentração viral relativa igual a um

5.6. Comparação entre as amostras biológicas

Na comparação entre as amostras biológicas, houve uma forte correlação positiva ($r = 0,879$), com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) para as concentrações virais relativas das amostras de soro e sangue total, conforme demonstrado na Figura 7. Para a análise das concentrações virais relativas das amostras de soro e “swab” nasal, obteve-se uma fraca correlação positiva ($r = 0,365$), com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$), a qual está apresentada na Figura 8. Na Figura 9 observa-se uma fraca correlação positiva ($r = 0,366$), com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre as concentrações virais relativas de PCV nas amostras de sangue total e “swab” nasal.

A carga viral relativa do PCV no sangue total foi cerca de 28 vezes maior que no soro e três vezes maior que no “swab” nasal. O “swab” nasal teve uma carga viral relativa para PCV 10 vezes maior, quando comparado com a concentração viral relativa do PCV no soro.

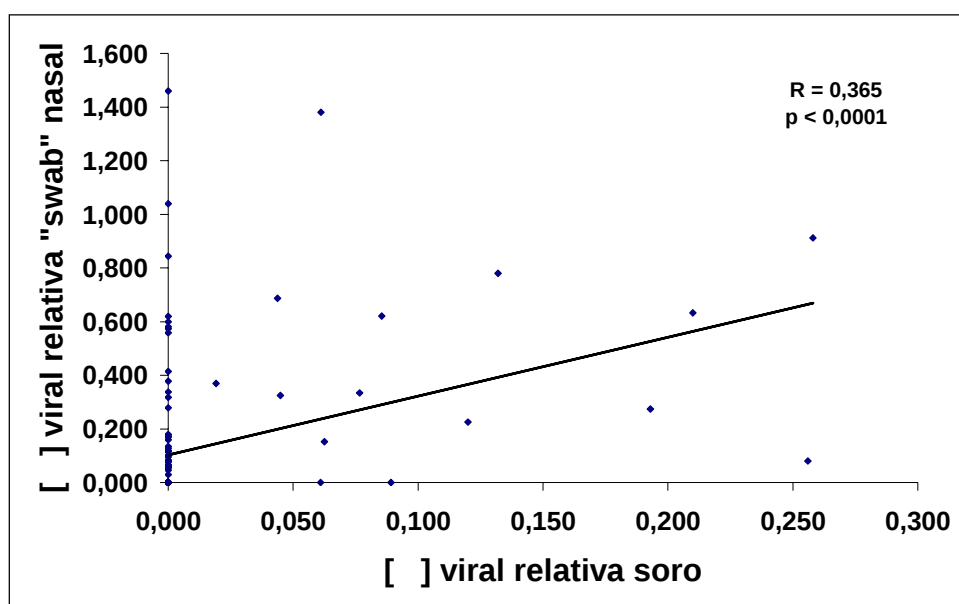


Figura 8: Correlação entre a concentração viral relativa do PCV obtida do soro e “swab” nasal dos leitões nas quatro colheitas

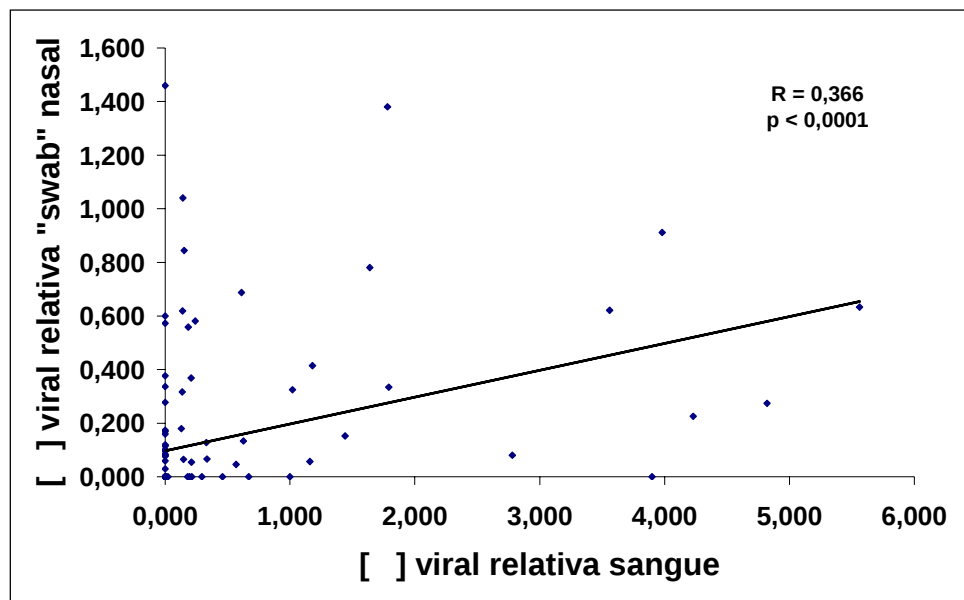


Figura 9: Correlação entre a concentração viral relativa do PCV obtida do sangue e “swab” nasal dos leitões nas quatro colheitas

5.7. Comparação entre a concentração viral relativa nas amostras analisadas e os pesos dos leitões

Para essas comparações foram utilizadas a somatória das cargas virais relativas de cada amostra biológica provenientes das quatro colheitas. Cada material (sangue total, soro e “swab” nasal) foi analisado separadamente com o ganho de peso dos leitões entre a primeira e quarta colheita e com a relação entre os pesos da quarta colheita com a primeira colheita.

Na Figura 10 estão apresentados os coeficientes de correlação ($r = -0,878$), indicando que houve uma forte correlação negativa, com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) para a comparação realizada entre a somatória da carga viral relativa do PCV na amostra de soro com o ganho de peso dos leitões entre a quarta e primeira colheita.

Na comparação entre a concentração viral relativa de PCV no sangue total com o ganho de peso dos leitões entre a quarta e primeira colheita, houve uma forte correlação negativa ($r = -0,842$), com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) (Figura 11).

Como demonstrado na Figura 12, obteve-se uma fraca correlação negativa ($r = -0,213$), sem diferença estatística significativa ($p = 0,2412$), na comparação entre a concentração viral relativa de PCV no “swab” nasal com o ganho de peso dos leitões entre a quarta e primeira colheita.

A comparação da somatória da carga viral relativa na amostra de soro com a relação entre os pesos dos leitões da quarta colheita pela primeira colheita, forneceu uma média correlação negativa ($r = -0,634$), com diferença estatística significativa ($p = 0,0001$), (Figura 13).

A concentração viral relativa na amostra de sangue total comparada com a relação entre os pesos dos leitões da quarta colheita pela primeira colheita, conforme demonstrado na Figura 14, indica que ocorreu uma média correlação negativa ($r = -0,668$), com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Para a associação realizada entre a somatória da carga viral relativa na amostra de “swab” nasal com a relação entre os pesos dos leitões da quarta colheita pela primeira colheita, foi obtida uma fraca correlação negativa ($r = -0,247$), sem diferença estatística significativa ($p = 0,1735$) (Figura 15).

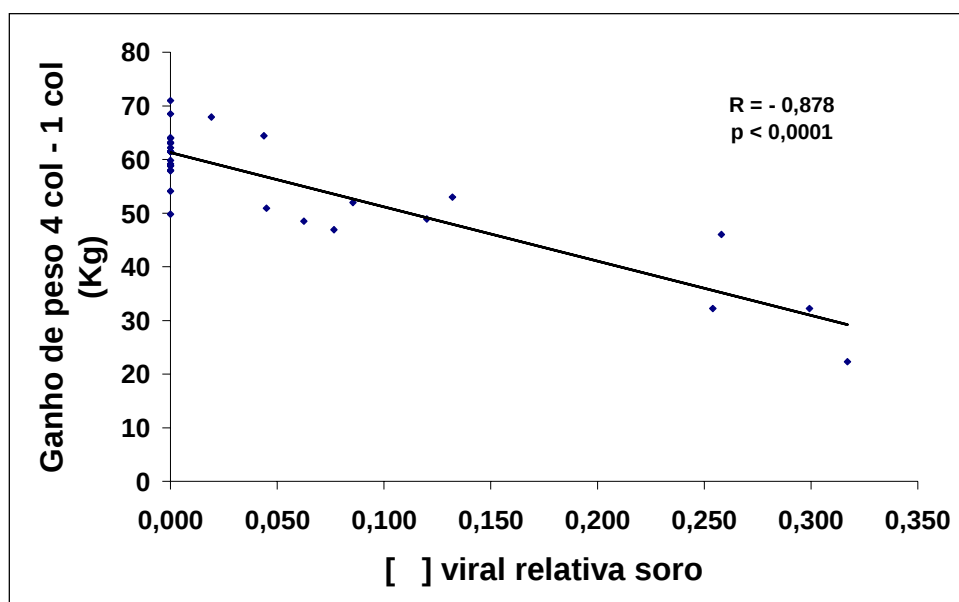
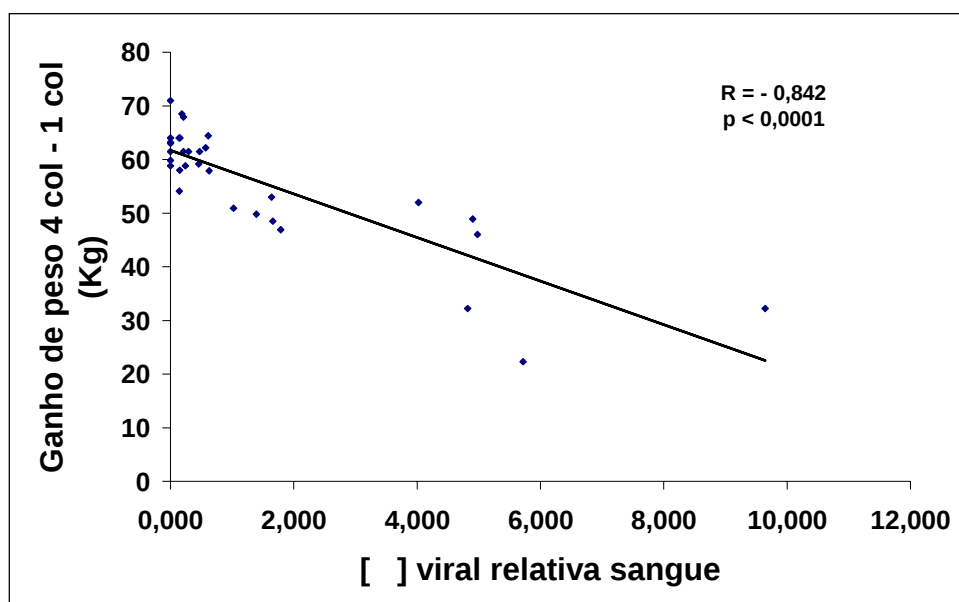


Figura 10: Correlação entre a somatória da carga viral relativa do PCV no soro nas quatro colheitas com o ganho de peso dos leitões entre a quarta e primeira colheita



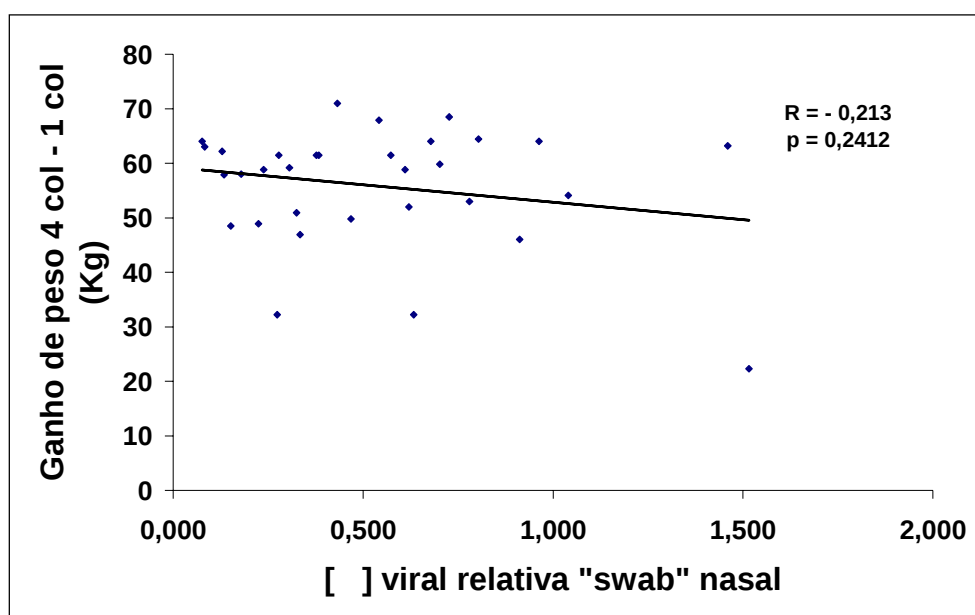


Figura 12: Correlação entre a somatória da carga viral relativa do PCV no “swab” nasal nas quatro colheitas com o ganho de peso dos leitões entre a quarta e primeira colheita

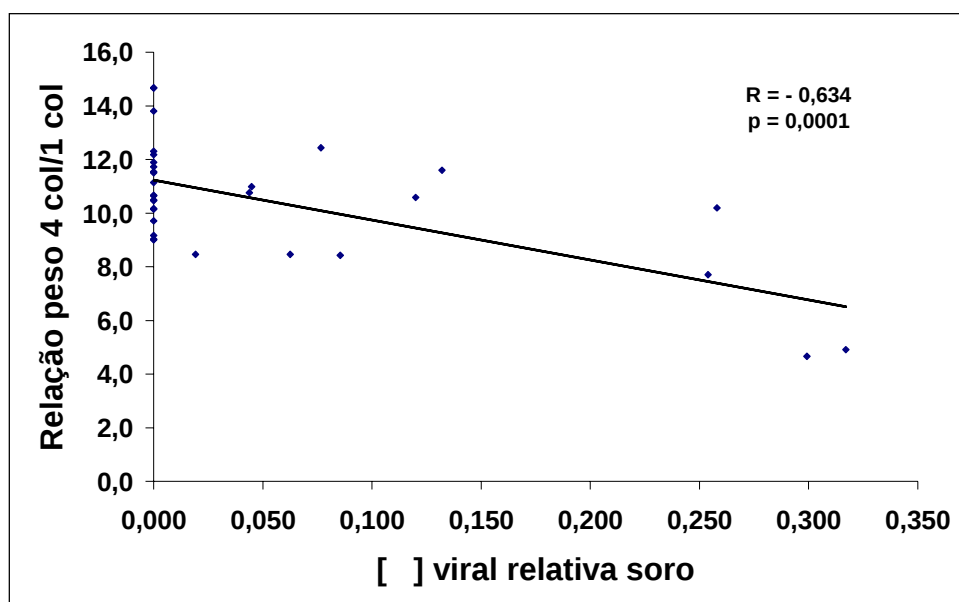


Figura 13: Correlação entre a somatória da carga viral relativa do PCV no soro nas quatro colheitas com a relação entre os pesos da quarta e primeira colheita

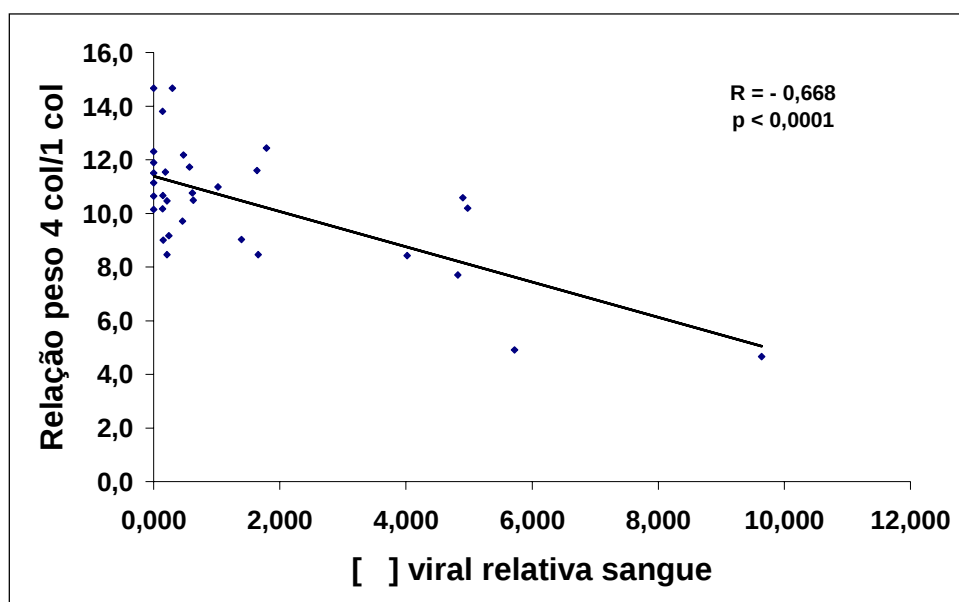


Figura 14: Correlação entre a somatória da carga viral relativa do PCV no sangue total nas quatro colheitas com a relação entre os pesos da quarta e primeira colheita

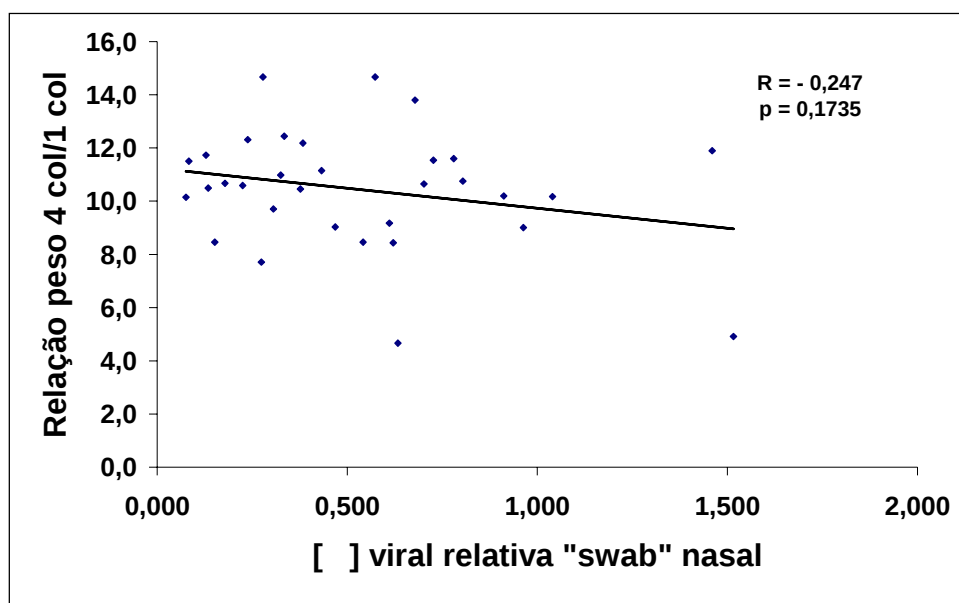


Figura 15: Correlação entre a somatória da carga viral relativa do PCV no “swab” nasal nas quatro colheitas com a relação entre os pesos da quarta e primeira colheita

6. Discussão

A PCR em tempo real empregada neste estudo utilizou o sistema de detecção baseado nos corantes que se intercalam nas duplas-fitas de DNA, como o SYBR[®] Green I, conjuntamente com os “primers” descritos por Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002) que utilizando o sistema de sondas de hibridização para quantificação, amplificaram uma região de 152 pb. Esse tamanho de produto está próximo do descrito por Giulietti et al. (2001) que recomendam produtos de 50 a 150 pb, os quais promovem uma amplificação mais eficiente. O sistema de detecção baseado no SYBR[®] Green I foi escolhido por possibilitar a sua utilização com diferentes “primers” para PCV, reduzindo os custos para aplicação da técnica quando comparada com sondas ou “primers” marcados com a substância fluorescente. Além disso, permite a análise da curva de dissociação indicando a especificidade analítica do teste. Esses “primers” foram analisados no BLAST e considerados bastante específicos para o PCV. Não foram utilizados na quantificação “primers” específicos para PCV2, uma vez que na granja estudada não foi encontrado o PCV1 por PCR. Assim, toda amplificação encontrada para PCV só poderia ser relacionada ao PCV2. Também a adoção dos “primers” direcionados para a região ORF1 do PCV e do sistema de detecção baseado no SYBR[®] Green I diminuiu a possibilidade de se obter resultados falso negativos, devido a maior variabilidade existente na região da ORF2 dos PCV, a qual é a mais utilizada para o desenho de “primers” específicos para o PCV2. Foram sintetizados “primers” para a PCR em tempo real específicos para PCV1 ou PCV2. Entretanto, como não foi encontrado o PCV1, a padronização e aplicação dos mesmos não foram realizadas.

A determinação da concentração viral relativa do PCV nas amostras testadas foi executada através da construção de uma curva padrão, constituída de quatro diluições do DNA de referência. As curvas de amplificação das diluições escolhidas estavam entre os ciclos 25 e 30 (Figura 1), pois neste intervalo as curvas de amplificação mantiveram os seus ângulos, indicando uma boa eficiência da reação. Com o aumento das diluições em duas vezes, esperou-se que o Ct fosse elevado em uma unidade, contudo, pelos resultados obtidos do Ct (Tabela 1), isso não ocorreu, mas houve pouca variação entre as médias das diluições, propiciando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,997 e uma curva padrão adequada a partir do DNA de referência (Figura 3). Para as quatro diluições selecionadas, a curva padrão também apresentou um coeficiente de correlação ($r = 0,998$) satisfatório. Como o SYBR[®] Green I liga-se em qualquer dupla-fita de DNA o sinal fluorescente de produtos inespecíficos e de “primer dimers” também é detectado (Ririe et al., 1997). Assim, a análise da curva de

dissociação é fundamental para verificar a existência de reações inespecíficas. Pela análise dessa curva (Figura 2), pode-se observar especificidade da reação com a formação de um pico único com a T_m entre 80,80 °C a 81,10 °C.

A quantificação relativa da carga viral do PCV através da curva padrão mostrou ser um método simples e permitiu a comparação da quantidade do PCV detectada nas amostras com relação ao DNA de referência menos diluído, o qual recebeu o valor igual a um, ou seja, uma amostra testada que apresentou uma carga viral relativa para o PCV igual a “n” foi “n” vezes maior ou menor que o DNA de referência com valor igual a um. Normalmente a quantificação relativa é determinada através da equação $Q_r = 2^{-\Delta C_t}$ onde Q_r é o valor da quantificação relativa e ΔC_t a diferença entre o valor de C_t da amostra teste em relação à amostra de referência (Livak & Schmittgen, 2001). Entretanto, esse cálculo só é válido quando a amplificação é extremamente eficiente, ou seja, a cada amplificação o número de cópias é duplicado. Isso raramente é obtido na prática, pois muitas variáveis podem interferir na amplificação, como tempo de rampa, qualidade da polimerase e “primers”, pureza do DNA alvo, concentração de íons Mg^{++} , entre outros (Sambrook & Russell, 2001). Com a adoção da curva padrão e o valor de um para a amostra de referência menos diluída, mesmo que a reação não seja tão eficiente, a determinação da concentração relativa é mais exata e precisa que aquela obtida com a aplicação do ΔC_t .

A quantificação relativa proporcionou uma informação suficiente para o objetivo do estudo, principalmente pelos animais terem sido acompanhados durante um período de tempo, com realização de várias colheitas de amostras, reforçando a análise comparativa com o DNA de referência. Assim, como o objetivo principal era avaliar a variável ganho de peso com a variável concentração do PCV nos leitões, independente do valor adotado para o DNA de referência, os resultados das análises de correlação, sempre seriam os mesmos.

Na aplicação da PCR em tempo real não foi utilizado um controle endógeno (GAPDH, β -actina, rRNA), o qual seria um gene de controle interno para corrigir pequenas variações devido às diferenças que possam existir na quantidade do ácido nucléico total extraído (Livak & Schmittgen, 2001). Essa não utilização foi devido à natureza das amostras colhidas e analisadas, ou seja, amostras livres de células como o soro ou com quantidades variáveis de células como o “swab”, independentes da concentração viral. Assim, a normalização dos resultados com o controle endógeno não forneceria uma quantidade verdadeira da concentração viral detectada do PCV.

A técnica utilizada apresentou como vantagens um menor custo para o seu desenvolvimento, maior especificidade fornecida pela análise da curva de dissociação,

diminuição no tempo de reação, menor risco de contaminação com produto de PCR e a determinação da concentração viral relativa do PCV através da curva padrão. Desta forma, a PCR em tempo real com SYBR® Green I foi aplicada para a detecção do PCV nas amostras de sangue total, soro e “swab” nasal e do ambiente.

Pela comparação das amostras, obteve-se uma forte correlação positiva ($r = 0,879$ e $p < 0,0001$) entre as concentrações virais relativas do PCV no soro e sangue total, sendo que a concentração viral relativa do PCV no sangue total foi cerca de 28 vezes maior que no soro. Essa maior concentração viral relativa no sangue total pode ser explicada pelo PCV2 ter um tropismo pelas células da linhagem monocítica/macrofágica, confirmada pela localização do antígeno viral dentro deste tipo celular e dos seus derivados (Krakowka et al., 2000; Kim et al., 2003; Darwich et al., 2004). Contudo, alguns autores sugerem que as propriedades de fagocitose dos macrófagos são as responsáveis pela presença do vírus no citoplasma dessas células e que as linhagens celulares monocítica/macrofágicas não são as células primárias que mantém a replicação do PCV2 (Gilpin et al., 2003), sendo também sugerido que as células epiteliais são mais permissíveis à replicação do PCV2 (Darwich et al., 2004).

Para a concentração viral relativa do PCV na amostra de “swab” nasal comparada, separadamente, com o soro ($r = 0,365$ e $p < 0,0001$) e sangue total ($r = 0,366$ e $p < 0,0001$), houve uma fraca correlação positiva, porém a concentração viral relativa no “swab” nasal foi aproximadamente 10 vezes maior que a do soro e três vezes menor que a do sangue total. Amostras de “swabs” nasais costumam ser utilizadas para verificação da eliminação viral, por detecção através das PCR quantitativas ou qualitativas (Krakowka et al., 2000; Shibata et al., 2003; Sibila et al., 2004; Segalés et al., 2005), sendo anteriormente relatada a detecção do PCV2 em uma grande proporção na cavidade nasal de leitões acometidos pela SCS ou não (Sibila et al., 2004; Segalés et al., 2005). A detecção do PCV2 nas cavidades nasais em leitões sem viremia, sugeriu a contaminação do ambiente com o vírus (Sibila et al., 2004), assim, foram realizadas colheitas de “swabs” do ambiente para verificação do potencial de contaminação do local e se este poderia interferir nos resultados obtidos a partir das amostras de “swabs” nasais colhidas dos leitões. Conforme os resultados obtidos, na fase de recria e crescimento observou-se uma maior quantidade de amostras positivas para o PCV no “swab” nasal, o que pode ser associado também com um ambiente mais contaminado quando se compara esses resultados com os da maternidade e creche. Baseando-se na fraca correlação positiva entre a concentração viral relativa do PCV no sangue total ou soro com a do “swab” nasal, pode-se concluir que a concentração viral determinada nas amostras de “swab” nasal, principalmente na recria e crescimento, poderiam conter vírus do ambiente contaminado e não

somente o PCV sendo eliminado pelas secreções nasais desses animais. Adicionalmente, os resultados positivos para PCV das amostras colhidas do ambiente indicaram que as instalações da granja estavam altamente contaminadas com o PCV, o qual por ser muito resistente à ação de desinfetantes e às condições do ambiente, dificulta o seu controle. No entanto, a detecção do DNA do PCV no ambiente não pode ser diretamente associado com a presença de vírus infeccioso no local.

A amostra de soro apresentou menor concentração viral relativa do PCV em comparação com o sangue total e “swab” nasal. Entretanto, segundo Segalés et al. (2005) a carga viral absoluta do PCV2 no soro, detectada pelo sistema “TaqMan” na PCR em tempo real foi maior que a do “swab” nasal. Vários estudos com PCR em tempo real foram desenvolvidos para a detecção do PCV2 no soro e associaram o aumento da carga viral do PCV2 com o desenvolvimento da SCS (Rovira et al., 2002; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Segalés et al., 2005). Além disso, a identificação do PCV2 nas amostras de sangue total e soro, durante longos períodos, está sendo associada com uma possível infecção persistente (Krakowka et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002; Shibata et al., 2003) o que pode favorecer a distribuição viral nos tecidos linfóides provocando as lesões microscópicas características da SCS (Calsamiglia et al., 2002; Kim et al., 2003).

Pelos resultados apresentados, o PCV pode ser identificado nos três tipos de amostras colhidas do animal vivo. O “swab” nasal é mais fácil e rápido de ser colhido do leitão, entretanto os resultados podem não refletir o verdadeiro “status” do animal pelo risco de contaminação ambiental, principalmente nas fases onde o PCV é mais eliminado. Logo, o resultado adquirido a partir dessa amostra deve ser analisado com cuidado. O sangue total foi considerado mais apropriado para a PCR em tempo real com SYBR[®] Green I seguido pelo soro em concordância com Shibata et al (2003), os quais concluíram que as amostras de sangue total e soro foram as mais convenientes para a PCR para PCV2.

De acordo com a porcentagem de leitões positivos em cada colheita para os três tipos de amostras (Figura 5), houve uma maior frequência de positividade nas colheitas realizadas na recria e crescimento, principalmente na recria. Nessas fases de produção, os leitões estavam com a idade média de 60,4 e 87,4 dias na recria e crescimento, respectivamente. Esses resultados estão em concordância com outros estudos (Shibata et al., 2003; Segalés et al., 2005) que demonstraram um aumento no número de leitões positivos após a fase de creche, ou seja, a partir de 30 a 45 dias de idade, sendo também reforçado pelas observações de casos naturais da SCS, nos quais os leitões são mais acometidos com 35 a 84 dias de idade (Allan & Ellis, 2000).

A granja acompanhada no estudo durante as colheitas apresentava uma forma suave da SCS, a qual pode ser diagnosticada conforme os três critérios definidos por Sorden (2000). Como no experimento não seria diagnosticada a SCS individualmente, efetuou-se o exame dos linfonodos inguinais e da coloração das mucosas dos leitões em cada colheita para avaliar a evolução da SCS. Uma vez que o emagrecimento progressivo é o principal sinal clínico da síndrome, a concentração viral relativa do PCV foi comparada com o ganho de peso e a relação entre os pesos obtidos dos animais. A relação entre os pesos foi adotada com o propósito de diminuir variações nos pesos dos animais devido às diferenças de idades entre eles. Houve correlação negativa entre a concentração viral relativa no sangue total e soro quando comparadas, separadamente, com o ganho de peso ou com a relação entre os pesos dos leitões, demonstrando que com o aumento da carga viral relativa do PCV nessas amostras houve uma diminuição do ganho de peso ou na relação entre os pesos dos leitões analisados. Entretanto essa correlação foi forte para o ganho de peso e média para a relação entre os pesos dos leitões. Desta forma, pode-se observar que mesmo os leitões infectados com PCV, sem apresentar um severo emagrecimento progressivo tiveram a taxa de crescimento afetada pela infecção viral, o que foi mais evidente nos leitões infectados na creche ou recria, como aconteceu com dois leitões (L27 e L31 no Quadro 2) que foram a óbito e apresentaram desde o início do experimento um menor ganho de peso e elevada concentração viral relativa do PCV nos três tipos de amostras. Estudos anteriores (Balasch et al., 1999; Albina et al., 2001) confirmam esses resultados e Ostanello et al. (2005) sugeriram que a infecção ativa causada pelo PCV2 pode afetar o ganho de peso dos leitões, mesmo na ausência de sinais clínicos ou lesões macroscópicas características da SCS. Contudo, Rovira et al. (2002) não encontrou diferença significativa no ganho de peso dos leitões inoculados experimentalmente somente com PCV2 (média do ganho de peso igual a 0,56 kg/dia), quando comparados com o grupo controle no experimento (média do ganho de peso igual a 0,64 kg/dia). Entretanto, esses autores avaliaram os leitões apenas por um período de 25 dias.

Para a amostra de “swab” nasal a correlação encontrada foi fraca, sem diferença estatística significativa em comparação com o ganho de peso ou com a relação entre os pesos dos leitões, diferindo das amostras de sangue total e soro, o que foi evidenciado pela comparação realizada entre elas. Mais uma vez os vírus do ambiente podem ter interferido na análise.

Pela PCR para PCV1 pode-se demonstrar a ausência de infecção dos leitões com este agente viral, sugerindo que o PCV1 pode ser raramente detectado na granja acompanhada no estudo, o que está de acordo com trabalhos anteriores, nos quais a quantidade de amostras

positivas para o PCV1 foi muito menor que a de PCV2 por PCR (Larochelle et al., 1999; Ouadani et al., 1999; Liu et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002). Além disso, Liu et al. (2000) desenvolveram uma PCR competitiva para a detecção do PCV1 e PCV2 em amostras de soro e observaram que os leitões clinicamente saudáveis foram positivos para PCV1 e PCV2, enquanto que na maioria dos leitões com SCS foi detectado somente o PCV2.

7. Conclusões

A PCR em tempo real com SYBR[®] Green I detectou o PCV nas amostras de sangue total, soro e “swab” nasal e do ambiente e possibilitou a determinação da concentração viral relativa nessas amostras através do cálculo da curva padrão, construída com o DNA de referência.

O sangue total foi a amostra mais apropriada para a detecção do PCV pela PCR em tempo real com SYBR[®] Green I, seguida pelo soro.

O PCV foi identificado em altas concentrações nas amostras do ambiente, o que pode induzir a resultados falso positivos nas amostras de “swab” nasal.

Com o aumento da concentração viral relativa do PCV nas amostras de sangue total ou soro houve uma diminuição do ganho de peso ou da relação entre os pesos dos leitões acompanhados no estudo, porém a interferência de outros fatores não foi analisada.

8. Referências Bibliográficas

ALBINA, E. et al. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. **J. Comp. Path.**, v. 125, p. 292-303, 2001.

ALLAN, G. M. et al. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, v. 41, n. 1, p. 17-26, 1994.

ALLAN, G. A. et al. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Vet. Microbiol.**, v. 44, p. 49-64, 1995.

ALLAN, G. M. et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes. **Vet. Rec.**, v. 142, n. 17, p. 467-468, 1998.

ALLAN, G. M. et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.**, v. 121, n. 1, p. 1-11, 1999.

ALLAN, G. M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, n. 1, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G.; ELLIS, J. Círcovírus suínos e doenças emergentes em suínos em todo o mundo. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE SAÚDE DE SUÍNOS, 1., 2001. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br>>. Acesso em: 15/06/01.

BALASCH, M. et al. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **J. Comp. Path.**, v. 121, p. 139-148, 1999.

BLANCHARD, P. et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Microbiol.**, v. 94, p. 183-194, 2003.

BRUNBORG, I. M. et al. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of health pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **J. Virol. Methods**, v. 122, p. 171-178, 2004.

BUSTIN, S. A. et al. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, p. 365-379, 2005.

CALSAMIGLIA, M. et al. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1848-1850, 2002.

CASTRO, A. M. M. G. et al. Detection and differentiation of porcine circovirus in Brazilian pigs. **Vet. Rec.**, v. 154, p. 728-729, 2004.

CLARK, E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1997, [S.1.]. **Proceedings...**[S.1.]: AASP, 1997. p. 499-501.

CORRÊA, A. M. R. et al. Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p. 9-13, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Síndrome Multissistêmica do Desmame do Leito Desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 1., 2000, Buenos Aires. **Memoria...** p. EIP16.

CIACCI-ZANELLA, J. R. et al. **Identificação no Brasil de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em tecidos arquivados em parafina desde 1988.** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2004. 3 p. (Comunicado Técnico, 388).

DARWICH, L. et al. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by *porcine circovirus 2*: an immune riddle. **Arch. Virol.**, v. 149, p. 857-874, 2004.

DORIA FILHO, U. Correlação e regressão linear. In:____. Introdução à bioestatística: para simples mortais. 3. ed. São Paulo: Negócio Editora, 2001. p. 121-129.

DULAC, G. C.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 4, p. 431-433, 1989.

ELLIS, J. A.; ALLAN, G. M. The natural history of porcine circoviruses. In: SYMPOSIUM POST-WEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS): A NEW EMERGIN DISEASE OF SWINE, 16., 2000, Melbourne. **Proceedings...**Melbourne: IPVS, 2000. p. 3-19.

FERNANDES, L. T. et al. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado no Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, p. 1-8, 2006.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GILPIN, D. F. et al. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 94, p. 149-161, 2003.

HAMEL, A. L. et al. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J. Virol.**, v. 72, p. 5262-5267, 1998.

HARDING, J. C. Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1997, [S.1.]. **Proceedings...**[S.1.]: AASP, 1997. p. 503.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8, p. 257-260, 2002.

KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and

comparison of nested PCR with in situ hybridization. **J. Virol. Methods**, v. 92, p. 105-111, 2001.

KIM, J. et al., Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v. 98, p. 25-31, 2001.

KIM, J. et al. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **J. Comp. Path.**, v. 128, p. 52-59, 2003.

KRAKOWKA, S. et al. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Vet. Pathol.**, v. 37, p. 254-263, 2000.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A. –S. et al. 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.**, v. 89, p. 97-114, 2002.

LAROCHELLE, R. et al. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **J. Virol. Methods**, v. 80, p. 69-75, 1999.

Li, Y. P. et al. Relative quantification and detection of different types of infectious bursal disease virus in bursa of Fabricius and cloacal swabs using real time RT-PCR SYBR green technology. **Res. Vet. Sci.**, 2006. In press.

LIU, Q. et al., Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3474-3477, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, D. T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUKERT, P. D.; ALLAN, G. M. Circovirus Porcine. In: STRAW, B. E. et al. **Enfermedades del cerdo**. 8.ed. Buenos Aires: Inter-Médica, 2000. p. 77-81.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. et al. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MANKERTZ, A. et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. **J. Virol.**, v. 71, p. 2562-2566, 1997.

MEEHAN, B. M. et al. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 221-227, 1997.

NAWAGITGUL, P. et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 2281-2287, 2000.

NAWAGITGUL, P. et al. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 33-40, 2002.

NIESTERS, H. G. M. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v. 25, p. 419-429, 2001.

OLVERA, A. et al. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **J. Virol. Methods**, v. 117, p. 75-80, 2004.

OSTANELLO, F. et al. Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 179-186, 2005.

OUARDANI, M. et al. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circovirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3917-3924, 1999.

QUINTANA, J. et al. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Rec.**, v. 149, p. 357-361, 2001.

RIRIE, M. K. et al. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p. 154-160, 1997.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M. et al. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. **Vet. Rec.**, v. 146, p. 762-764, 2000.

ROSELL, J. C. et al. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **J. Comp. Path.**, v. 120, p. 59-78, 1999.

ROVIRA, A. et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. **J. Virol.**, v. 76, n. 7, p. 3232-3239, 2002.

SAMBROOK, J; RUSSELL, W. D. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In:____. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 8.1-8.126.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Vet. Quart.**, v. 24, p. 109-124, 2002.

SEGALÉS, J. et al. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbiol.**, v. 98, p. 137-149, 2004.

SEGALÉS, J. et al. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Microbiol.**, v. 111, p. 223-229, 2005.

SHIBATA, I. et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimental infected pigs and field cases. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, p. 405-408, 2003.

SIBILA, M. et al. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Am. J. Vet. Res.**, v. 65, n. 1, p. 88-92, 2004.

SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, v. 8, n. 3, p. 133-136, 2000.

STEVENSON, G. W. et al. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. **Vet. Pathol.**, v. 36, p. 368-378, 1999.

TISCHER, I. et al. Characterization of papovavirus- and piconarvirus –like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl. Bakteriол. Org. A.**, v. 226, p. 153-167, 1974.

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

TISCHER, I. et al. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. **Arch. Virol.**, v. 140, n. 8, p. 1427-1439, 1995.

WALKER, I. W. et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 400-405, 2000.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. et al. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 254-298, 2006.

Glossário

PCR em tempo real: detecta em cada ciclo da reação o sinal fluorescente produzido a partir do produto da amplificação em tempo real. O aumento do sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do DNA formado em cada ciclo e essa informação se reflete graficamente em curvas de amplificação para cada uma das amostras e controles testados. A curva de amplificação é usada para definir a fase exponencial da reação, a qual é o pré-requisito para o cálculo acurado do número de cópias iniciais no começo da reação. Para a produção do sinal fluorescente, vários sistemas de detecção podem ser adotados na PCR em tempo real.

Sistema de detecção com SYBR® Green I: o SYBR® Green I é um agente intercalante das duplas-fitas de DNA. Na PCR em tempo real, ele se liga ao produto formado, ocorrendo um aumento do sinal fluorescente, o qual é detectado em cada ciclo da reação. Como o SYBR® Green I se liga em qualquer dupla-fita de DNA (produtos inespecíficos ou “primers dimers”), a especificidade da reação deve ser analisada através da curva de dissociação.

Sistema de detecção pelo “TaqMan”: a reação deve ser desenvolvida com dois “primers” e uma sonda marcada com duas substâncias fluorescentes. Essa sonda é denominada “TaqMan”. As substâncias fluorescentes compreendem uma molécula (“reporter”) na extremidade 5’ que emite fluorescência ao ser excitado e outra molécula (“quencher”) na extremidade 3’, a qual absorve a fluorescência liberada pela primeira molécula. Isso ocorre somente quando as duas moléculas estão próximas, ou seja, a sonda está intacta com as duas moléculas. Após a hibridização da sonda com a fita-simples de DNA, inicia a fase de extensão da Taq DNA polimerase que tem atividade de exonuclease e promove a clivagem da sonda. Então, as duas moléculas são separadas e a emissão fluorescente do “reporter” pode ser detectada pelo aparelho, pois não há o “quencher” para absorver essa emissão. Nesse sistema não é possível a utilização da curva de dissociação.

T_m (“melting temperature”): temperatura na qual 50 % das fitas estão associadas e 50 % das fitas estão dissociadas.

Curva de dissociação: baseia-se na aplicação de um gradiente de temperaturas crescentes depois da PCR para monitorar a cinética de dissociação dos fragmentos amplificados. A partir

disso, pode-se determinar a T_m dos produtos da PCR para comprovar sua especificidade. Uma vez que a forma da curva de dissociação é uma função do conteúdo de guanina e citosina, comprimento e sequência, ela permite a diferenciação dos produtos da amplificação pela T_m obtida.

“Baseline”: constitui o ruído basal da reação presente nos ciclos iniciais, nos quais há pouca alteração no sinal fluorescente (Figura 16). A determinação do “baseline” engloba o ruído inicial da reação até o aparecimento da primeira amplificação.

“Threshold”: representa o limiar da reação que deve ser determinado na fase exponencial da curva de amplificação (Figura 16). A partir desse limiar, pode-se calcular o C_t (“threshold cycle”).

C_t (“threshold cycle”): corresponde à fração do número do ciclo na qual a fluorescência alcança o “threshold” (Figura 16). O C_t é inversamente proporcional à quantidade do número de cópias do DNA do alvo.

Curva de amplificação: possui a fase exponencial, fase linear e fase platô. Na fase exponencial a eficiência da reação é ótima, na fase linear os reagentes da reação começam a ficar escassos e a amplificação do gene alvo diminui e na fase platô não ocorre amplificação desse gene alvo (Figura 16).

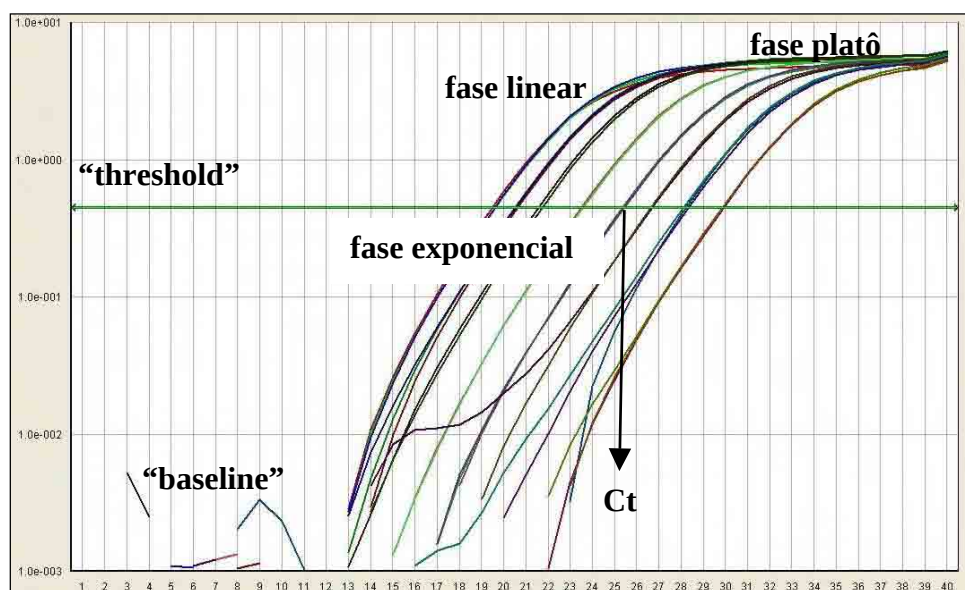


Figura 16. Exemplo de curvas de amplificação e representação dos termos usados na PCR em tempo real

Controle endógeno interno: corresponde a um gene constitutivo presente em cada amostra que será testada. A sua expressão gênica deve ser a mesma em qualquer tipo de amostra usada no estudo e não deve sofrer alterações com o tratamento empregado no experimento. O controle endógeno interno com essas características é utilizado para normalizar os resultados obtidos para o gene alvo, devido às diferentes quantidades do ácido nucléico que podem ser obtidas a partir dos procedimentos de extração.