

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE PARVOVIRUS CANINO 2 COM USO DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

ANA CAROLINA YAMAKAWA

Botucatu/SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE PARVOVIRUS CANINO 2 COM USO DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

ANA CAROLINA YAMAKAWA

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

Orientador: Prof^o Dr. João Pessoa Araújo
Junior

Coorientadora: Prof^a Dra. Caroline
Rodrigues Basso

Botucatu/SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Yamakawa, Ana Carolina.

Detecção de parvovirus canino 2 com uso de nanopartículas de ouro : Detecção de PVC-2 com AuNPs / Ana Carolina Yamakawa.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Caroline Rodrigues Basso

Capes: 50502000

1. Biossensores. 2. Parvovirus canino. 3. Nanopartículas.
4. Ouro.

Palavras-chave: Biossensores; Nanopartículas de ouro; PVC-2.

Nome do autor: Ana Carolina Yamakawa

Título: Detecção de parvovirus canino 2 com uso de nanopartículas de ouro

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº Dr. João Pessoa Araújo Junior

Presidente e orientador

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, SP, Brasil

Profº Dr. Paulo Inácio da Costa

Membro

Departamento de Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Araraquara, SP, Brasil

Profº Dr. Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, SP, Brasil

Data da Defesa: 30 de junho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Claudia Simone Alves de Lima Yamakawa e Carlos Narayoro Yamakawa. Vocês são minha inspiração e base, cada conquista minha e do Caio é resultado de todo amor, carinho e suporte que vocês proporcionaram. Espero poder um dia retribuir tudo que fizeram por nós.

Ao meu irmão Caio Haruo Yamakawa e minha cunhada Mariana Bourscheid Cezimbra, pelo suporte e apoio nos desabafos. As minhas avós Ana Maria Alves de Lima e Hifumi Yamakawa (*in memoriam*) por serem exemplos de mulheres batalhadoras, minhas segundas mães. A toda minha família que sempre esteve ao meu lado com boas risadas, em especial meu tio Jonas Flavio Alves de Lima por sempre me incentivar a perseguir meus sonhos e estudar.

Ao meu amor Hugo Akira Higo. Seu companheirismo, apoio e suporte foram essenciais para conquistar essa etapa. Obrigada por compartilhar esses anos comigo, sempre deixando tudo mais leve e divertido.

As minhas amigas da graduação na UFPR, Thais Luiza da Silva, Mariana Mika Fujimura, Suzana Maria Rocha, Jéssica Skruch Delfino, Maisa Dias e Renata Louise. Obrigada pelas risadas, estudos e histórias compartilhadas durante a graduação.

As minhas amigas do grupo de pesquisa em Medicina Veterinária do Coletivo da UFPR, Maysa Pellizzaro, Graziela Ribeiro da Cunha, Evelyn Cristine da Silva, Suzana Maria Rocha e Amanda Haisi. Obrigada pela orientação, ensinamentos e turismos científicos.

As minhas amigas do período da residência em Zoonoses e Saúde Pública, Mariana Guimarães Nilsson, Karine Bott Mantovan, Gabrielle Miodutzki e Evelyn Cristine da Silva. Incluo também a minha companhia diária nesse período, Larissa Mary Pchevuzinske. Obrigada por todas as risadas, desabafos e amizades.

Aos residentes e docentes de Moléstias Infecciosas do hospital veterinário da UNESP e equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário, pelo auxílio na aquisição das amostras. Em especial ao professor Márcio Garcia Ribeiro, por ter firmado a ajuda com os residentes.

Aos meus amigos da Higo Peixaria e Higo Cozinha. Obrigada pelas risadas e brincadeiras, deixando meus dias sempre mais leves.

Aos meus amigos e colegas do IBTEC, por cada desabafo acompanhado de café com bolo que fez minhas tardes mais alegres e leves, obrigada.

Aos professores e alunos do setor de química e bioquímica e aos funcionários do serviço de Microscopia Eletrônica da UNESP, obrigada pela ajuda e atenção. Em especial ao Professor Valber de Albuquerque Pedrosa por ter permitido que eu realizasse parte dos experimentos em seu laboratório. Além das boas risadas e histórias.

Ao professor Alexander Welker Biondo. Meu interesse pela pesquisa começou com as oportunidades que você me proporcionou. Obrigada por ajudar e estar presente em boa parte do meu percurso.

Ao professor Helio Langoni, meu preceptor da residência médica. Obrigada por cada oportunidade e auxílio que recebi durante e após o período de residência.

A minha coorientadora e amiga Caroline Rodrigues Basso. Sou grata não só pela orientação científica, mas por cada conversa, suporte e ombro amigo. Obrigada pela amizade que levarei pelo resto da minha vida.

A meu orientador João Pessoa Araújo Junior obrigada pela orientação e aprendizados. Obrigada de coração por cada oportunidade que você me proporcionou, cada protocolo e experimento que tive o privilégio de ajudar, executar e aprender.

A realização do presente trabalho só foi possível com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2020/01629-3). Agradeço também ao apoio da Fundação do Instituto de Biociências (Fundibio) pelo auxílio nos meses finais.

Não sei como será daqui para frente, mas só tenho gratidão pelo que vivi até aqui.

A todos que de alguma forma participaram da minha jornada, obrigada.

Ciclos

“(...) Fechar um ciclo é trocar de pele começar de novo, mais forte, mais resolutivo, mais determinado. Chore, sofra, aprenda. Cresça. Seja cada vez mais feliz. Uma árvore é feita de ciclos, fases que a formam e moldam. E como as árvores, nosso limite é o céu.”

Carolina C. Pedrosa

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação dos diagnósticos mais comuns para detecção do PVC-2.....	9
TABELA 2 - Amostras selecionadas para NGS.....	16
TABELA 3 - Dados de ciclo de quantificação médio e unidades hemaglutinantes das amostras de fezes.....	22
TABELA 4- Resultado de qPCR das amostras isoladas em cultivo celular.....	25
TABELA 5 - Dados de reads totais e alinhados ao genoma de referência por amostra.	28
TABELA 6 - Características de 15 aminoácidos da proteína VP2 e códons de seu gene das amostras sequenciadas.....	29
TABELA 7 – Valores do comprimento de onda das amostras positivas (1 ao 60) e negativas (1 a 5 e PBS) para as imunoglobulinas monoclonal, policlonal e a combinação de ambas.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema do capsídeo, genoma e proteínas codificadas do PVC-2.	6
FIGURA 2 - Esquema básico de um sistema de biossensor óptico.	12
FIGURA 3 - Imagens do processo de produção das AuNPs e espectro UV-Vis. A – Solução de H _{Au} Cl ₄ diluída. B – Solução de H _{Au} Cl ₄ em ebulição, etapa para adição de citrato de sódio. C – Solução de AuNPs na coloração adequada em agitação sem aquecimento. D – Gráfico da solução de H _{Au} Cl ₄ não absorvendo luz. E – Solução com as nanopartículas de ouro interagindo com a luz a 520 nm.	19
FIGURA 4 - Gráfico da curva padrão de eficiência e gráfico de amplificação da reação de qPCR para PVC-2.	22
FIGURA 5 - Gráfico de distribuição dos resultados de C _q médio e Log ₂ (UHA) das 49 amostras.	24
FIGURA 6 - Fotos do acompanhamento do cultivo celular após inoculação das amostras virais. A – Linhagem MDCK A8 no momento da inoculação viral em aumento de 40x. B – Linhagem CRFK A8 após 24h pós inoculação viral (aumento de 20x). C – Linhagem CRFK A8 apresentando perda da confluência das células após 120 h pós inoculação (aumento de 20x). D – Controle negativo da linhagem CRFK no tempo 120 h (aumento 20x). ...	25
FIGURA 7 - Mapa da placa utilizada na técnica hemaglutinação.	26
FIGURA 8 - Placa de hemaglutinação.	27
FIGURA 9 - Placa de inibição da hemaglutinação.	27
FIGURA 10 – Gráfico do espectro UV-Vis das AuNPs e monocamadas auto-organizadas.	30
FIGURA 11 - Análise de tamanho e índice de polidispersão por DLS das AuNPs.	31
FIGURA 12 - Análise das AuNPs pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro das AuNPs.	32
FIGURA 13 - Gráfico do espectro de UV-vis do experimento com diferentes diluições (Puro, 1:10, 1:100, 1:200 e 1:400) do anticorpo policlonal em PBS.	32
FIGURA 14 – Gráfico do espectro de UV-vis do experimento com diferentes concentrações (0,5; 1,5; 2 e 2,5 µg/mL) do anticorpo monoclonal em diluído em PBS.	33

- FIGURA 15 - Análise de comprimento de onda e absorbância das imunoglobulinas e amostra de cultivo celular CRKF A8. A – Gráfico do UV-Vis da imunoglobulina monoclonal e amostra CRFK A8. B – Gráfico do UV-Vis da imunoglobulina policlonal e amostra CRFK A8. C – Gráfico do UV-Vis da combinação das imunoglobulinas monoclonal e policlonal, e após a adição da amostra CRFK A8..... 34
- FIGURA 16 - Gráficos de absorbância e comprimento de onda de amostras de fezes e imagem da mudança de cor da solução. A - Gráfico das amostras negativas para PVC-2 e positivas para *Giardia* spp. B - Gráfico das amostras positivas para PVC-2. C - Imagem da mudança de cor da solução nas amostras positivas para *Giardia* spp. e negativas para PVC-2..... 35
- FIGURA 17 - Análise da mudança da coloração da solução de AuNPs com amostra 8 positiva e 3 negativa, nas diluições 1:10, 1:100 e 1:200. 36
- FIGURA 18 - Gráfico do espectro de UV-vis da análise do comprimento de onda entre a amostra negativa 3 diluída 1:10, filtrada e não filtrada com filtro de seringa 0,22 μ m..... 36
- FIGURA 19 - Teste de adição de amostras positivas (A46, A56 e A57) e negativas (Neg1 e Neg2) para PVC-2 diretamente na solução de AuNPs sem formação do complexo. 38
- FIGURA 20 – Avaliação de agregação das AuNPs e consequente mudança de cor da solução, com diferentes diluições de amostras negativas (Neg1 a 5) para PVC-2 (Negativas 1 a 5)..... 39
- FIGURA 21 - Análise de comprimento de onda da solução de AuNPs com formação de complexo e diferentes anticorpos, antes e após a adição das amostras negativas (1 e 2) diluídas na proporção 1:150. A - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal (2,5 μ g/ml). B - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo policlonal (1:100). C - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal e policlonal (1:1)..... 40
- FIGURA 22 – Fluxograma do preparo e realização dos experimentos. 41
- FIGURA 23 - Imagem de comparação da coloração da solução contendo as AuNPs, após adição do MUA, do EDC/NHS, da imunoglobulina híbrida, das amostras positivas A8 e A15, da negativa 4 e com adição de PBS. 42
- FIGURA 24 - Análise do comprimento de onda da solução de AuNPs com diferentes anticorpos e após a adição de amostras positivas (22, 24, 25 e 28) e PBS. A

- Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal (2,5 µg/ml). B - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo policlonal (1:100). C - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal e policlonal (1:1). 45
- FIGURA 25 - Gráfico da comparação entre medianas e limites superior e inferior do comprimento de onda das imunoglobulinas (monoclonal, policlonal e combinação de ambas [1:1]), amostras negativas e positivas. 47
- FIGURA 26 - Comparação entre a diferença do comprimento de onda das etapas com as imunoglobulinas monoclonal, policlonal e a combinação de ambas, e após a adição das amostras positivas e negativas. 48
- FIGURA 27 - Análise do complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro do complexo. 49
- FIGURA 28 - Análise do complexo após adição de amostra positiva A8 pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro do complexo mais amostra A8. 49
- FIGURA 29 - Fotos da MET. A - AuNPs em escala de 500nm com aproximadamente 23 nm de diâmetro. B – Etapa da formação do complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS. C – Após a adição da combinação dos anticorpos monoclonal e policlonal formando o complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas. D – Solução após adição da amostra positiva (A8), formando o complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas@parvovirus. 50
- FIGURA 30 - Análise do limiar de detecção do protocolo. A - Gráfico do UV-Vis da amostra A12 diluída. B – Comparação dentre os valores de comprimento de onda e o Log₂ das respectivas diluições. 51
- FIGURA 31 – Gráfico da análise do comprimento de onda da solução de AuNPs com complexo após adição de amostras interferentes. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

μL = microlitro

aa = aminoácidos

AuNPs = nanopartículas de ouro

CRFK = células da linhagem Crandell oriundas de rim feline

Cq = ciclo de quantificação

DLS = Dispersão dinâmica de luz

DNA = ácido desoxirribonucléico

EDC = N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA = ensaio de imunoabsorção enzimática

GITC = isotiocianato de guanidina

HA = teste de hemaglutinação

HAuCl_4 = ácido cloroáurico

HI = teste de inibição da hemaglutinação

LSPR = ressonância plasmônica de superfície localizada

MET = microscopia eletrônica de transmissão

MEM = meio essencial mínimo

MDCK = células da linhagem Madin Darby de rim canino

ml = mililitro

MUA = 11-ácido mercaptoundecanóico

MVC = minute vírus canino

MI = setor de moléstias infecciosas

NGS = Next Generation Sequencing / Sequenciamento de nova geração

NHS = N-hidroxissuccinimida

NSs = proteínas não estruturais

ORF = open reading frames

PBS = tampão fosfato salino

PCR = reação em cadeia da polimerase

PVC-1 = primeiro parvovirus canino

PVC-2 = parvovirus canino tipo 2

qPCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAMs = monocamadas auto-organizadas

SFB = soro fetal bovino

UHA = unidade hemaglutinante

VPF = vírus da panleucopenia felina

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Parvovirus canino 2.....	5
2.2 Parvovirose canina	6
2.3 Diagnósticos disponíveis para PVC-2.....	9
2.4 Biossensores e nanopartículas de ouro.....	11
3. OBJETIVOS	14
3.1 Gerais	14
3.2 Específicos	14
4. MATERIAIS E METODOS	14
4.1 Obtenção das amostras	14
4.2 Diagnóstico Molecular	15
4.3 Sequenciamento de nova geração	16
4.4 Isolamento viral.....	17
4.5 Titulação viral	18
4.6 Preparação e caracterização das nanopartículas de ouro.....	18
4.7 Produção e caracterização das monocamadas auto-organizadas sobre as AuNPs de ouro.....	20
4.8 Padronização da metodologia de detecção do PVC-2.....	20
4.9 Forma de análise dos resultados.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 Diagnóstico molecular e titulação viral.....	21
5.2 Isolamento viral.....	24

5.3 Sequenciamento de nova geração	28
5.4 Síntese das AuNPs e formação do complexo.....	30
5.5 Padronização com amostras biológicas.....	34
5.6 Experimentos com as amostras	40
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS.....	53

YAMAKAWA, A. C. **Detecção de parvovirus canino 2 com uso de nanopartículas de ouro**. 2022. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

RESUMO

A parvovirose canina, causada pelo parvovírus canino 2 (PVC-2), acomete principalmente cães jovens não vacinados, causando um quadro gastrointestinal grave que pode levar a morte. O desenvolvimento de técnicas diagnósticas de baixo custo e rápidas são necessários, uma vez que somente o diagnóstico clínico não é conclusivo. Biossensores, como as nanopartículas de ouro, possuem características físico-químicas dinâmicas que possibilitam a transdução de diversos sinais (ópticos, plasmônicos, eletroquímicos), o que os torna eficientes sensores. O objetivo do presente projeto foi desenvolver e padronizar a identificação de PVC-2 a partir de amostras de fezes, utilizando nanopartículas de ouro modificadas com a deposição de anticorpos. Protocolo foi padronizado com uso de anticorpo monoclonal, policlonal e a combinação de ambos. Um total de 60 amostras de fezes positivas e 5 negativas na qPCR para PVC-2 foram submetidas a técnica após diluição na proporção 1:150 em PBS. Para todos os anticorpos houve um aumento significativo no comprimento de onda pela técnica de LSPR após a adição das amostras positivas. A combinação de ambos os anticorpos apresentou a maior diferença. Em contrapartida, ao adicionar as amostras negativas, não houve diferença estatisticamente significativa no comprimento de onda em comparação a etapa com os anticorpos. Amostras de adenovirus e circovirus suíno 2 também foram submetidas a técnica, não sendo detectado ligações inespecíficas. Ao comparar os valores de aumento do comprimento de onda, com os resultados de qPCR e hemaglutinação, não foi constatada uma correlação de valores, evidenciando que esse protocolo apresenta resultados qualitativos (positivo e negativo). Em conclusão, a detecção do PVC-2 foi confirmada pela análise de LSPR, sendo essa uma técnica que proporciona um diagnóstico sensível e específico de forma rápida (~ 40 min) e com baixo custo (~R\$5/amostra). Os resultados aqui encontrados são promissores, podendo servir de base para futuros protocolos de *point of care testing*.

Palavras-chave: biossensores, nanopartículas de ouro e PVC-2.

YAMAKAWA, A. C. **Canine parvovirus 2 detection with a gold nanoparticles protocol**. Botucatu, 2022. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Canine parvovirus, caused by canine parvovirus 2 (CPV-2), affects mostly young unvaccinated dogs, causing a severe gastrointestinal condition that can lead to death. The development of low-cost and rapid diagnostic techniques is necessary, since only clinical diagnosis is not conclusive. Biosensors, such as gold nanoparticles, have dynamic physicochemical characteristics that allow the transduction of various signals (optical, plasmonic, electrochemical), which makes them efficient sensors. The objective of the present project was to develop and standardize the identification of CPV-2 from stool samples using gold nanoparticles modified with antibody deposition. Protocol was standardized using monoclonal antibody, polyclonal antibody, and combination of both. A total of 60 stool samples positive and 5 negatives in qPCR for CPV-2 were submitted to the technique after dilution at a ratio of 1:150 in PBS. For all antibodies there was a significant increase in wavelength by the LSPR technique after the addition of the positive samples. The combination of both antibodies showed the greatest difference. In contrast, when adding the negative samples, there was no statistically significant difference in wavelength compared to the step with the antibodies. Samples of adenovirus and porcine circovirus 2 were also submitted to the technique, and no nonspecific binding was detected. When comparing the wavelength increase values, with the qPCR and hemagglutination results, no correlation of values was found, evidencing that this protocol presents qualitative results (positive and negative). In conclusion, the detection of CPV-2 was confirmed by LSPR analysis, and this is a technique that provides a sensitive and specific diagnosis quickly (40 min) and at low cost (~R\$5/sample). The results found here are promising and may serve as a basis for future point of care testing protocols.

Keywords: Biosensors, gold nanoparticles e CPV-2

1. INTRODUÇÃO

O parvovirus canino 2 (PVC-2) é um dos principais agentes causais de gastroenterites em cães, acometendo majoritariamente animais jovens apresentando uma alta mortalidade (LAMM; REZABEK, 2008). Causa uma enfermidade infectocontagiosa aguda, com altos índices de transmissibilidade, cujo a principal via de transmissão é a oronasal (BEHDENNA *et al.*, 2019; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; GOGONE *et al.*, 2020).

O primeiro parvovirus canino (PVC-1), inicialmente conhecido como “minuto vírus canino” (MVC), foi isolado de cães assintomáticos em 1967 (BINN *et al.*, 1970). Quase 10 anos após sua descoberta, o vírus reemergiu e foi relacionado a mortes neonatais de cães, com quadros gastrointestinais e respiratórios, porém ainda com infecção assintomática na maioria dos casos (GODDARD; LEISEWITZ, 2010; LAMM; REZABEK, 2008).

Em meados de 1978, outro vírus similar ao PVC-1 e ao vírus da panleucopenia felina (VPF), foi identificado de amostras de cães jovens com quadros gastrointestinais e/ou miocardite (BURTONBOY *et al.*, 1979; KELLY, 1978). Esse novo patógeno foi então chamado de parvovirus canino 2, diferenciando-se antigênicamente do PVC-1/MVC (CARMICHAEL; BINN, 1981; CARMICHAEL; SCHLAFER; HASHIMOTO, 1994). Desde o ano de 2013 a atual taxonomia engloba o PVC-2, na espécie *Carnivore protoparvovirus 1* (COTMORE *et al.*, 2019).

A origem do PVC-2 ainda não é totalmente elucidada. As principais teorias envolvem sua evolução do vírus da panleucopenia felina (VPF) como uma variante, devido suas similaridades (PARRISH; CARMICHAEL, 1983), ou que ambos se originaram em um ancestral antigênicamente semelhante, como carnívoros selvagens (TRUYEN, 1999). Outra teoria que suporta sua aparição quase simultânea no mundo, é a emergência a partir de uma cepa vacinal do vírus da panleucopenia felina (VPF) (TRUYEN, 1999).

Com a ausência de uma imunidade prévia, o vírus se espalhou mundialmente nas populações de cães até os anos 1980's (CARMICHAEL; BINN, 1981). Diferenças antigênicas entre os isolados no início da emergência do vírus, e os isolados após 1980, detectadas com o uso de anticorpos monoclonais indicaram a ascendência de sua primeira variante, o PVC-2a (PARRISH *et al.*, 1985, 1988). Essa nova variante se mostrou

evolutiveamente vantajosa em relação ao PVC-2 original, substituindo-o rapidamente em um período de 2-3 anos em todo mundo (PARRISH *et al.*, 1988). Poucos anos depois, em 1984, a segunda variante PVC-2b começou a ser reportada (PARRISH *et al.*, 1988).

Em 2000 uma terceira variante, PVC-2c, foi isolada na Itália (BUONAVOGLIA *et al.*, 2001). Entretanto, estudo retrospectivo identificou o PVC-2c em uma amostra de 1996 na Alemanha, indicando que essa variante já circulava no país antes de ser isolada na Itália (DECARO *et al.*, 2007a). Em um curto período de tempo, essa nova variante com maior morbidade e mais virulenta começou a ser reportada mundialmente (DECARO *et al.*, 2006; HONG *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2007; STRECK *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2008).

Atualmente, todas as variantes estão disseminadas mundialmente, sendo a principal causa de enteropatia em cães (OLIVEIRA SANTANA *et al.*, 2022; MIRANDA; THOMPSON, 2016). A principal via de infecção é a oronasal através do contato com fezes contaminadas, com período de incubação de três a sete dias (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). A parvovirose canina é conhecida pela diarreia sanguinolenta característica, acompanhada de vômito, perda de apetite, apatia, depressão, febre e desidratação em animais jovens, com alta morbidade e óbitos (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; LAMM; REZABEK, 2008).

O PVC-2 também pode causar um quadro de miocardite em cães nas suas duas primeiras semanas de vida, sendo um quadro com rápido desenvolvimento que leva a insuficiência cardíaca, arritmias e a morte (SIME *et al.*, 2015; TAVORA *et al.*, 2008). Quadros com diminuição de células brancas também são características da infecção pelo PVC-2, devido a migração para medula óssea (NANDI; KUMAR, 2010).

Devido a rápida progressão e piora do quadro clínico, junto ao perfil socioeconômico da doença, diagnósticos rápidos, práticos e pouco onerosos são ideais. Nesse âmbito, o objetivo do presente projeto foi o desenvolvimento um método de detecção confiável e economicamente acessível para parvovirus canino tipo 2, utilizando nanopartículas de ouro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parvovirus canino 2

A família *Parvoviridae* engloba duas subfamílias, *Densovirinae* e *Parvovirinae*. A subfamília *Parvovirinae* compreende oito gêneros: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Tetraparvovirus* e *Protoparvovirus* (COTMORE *et al.*, 2019; ICTV, 2021). O gênero *Protoparvovirus* atualmente compreende 11 espécies (COTMORE *et al.*, 2019; ICTV, 2021), dentre elas a *Carnivore protoparvovirus 1* (canine parvovirus 2; PVC-2), responsável por causar doença em cães.

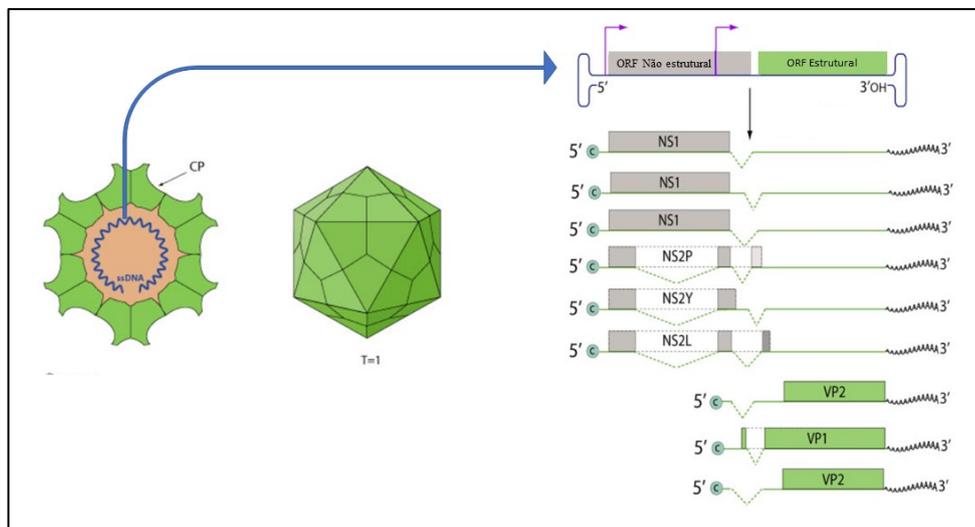
Os parvovirus são vírus pequenos, com um capsídeo de simetria T=1 formado por 60 proteínas virais com um diâmetro de aproximadamente 25nm e não envelopado (MIETZSCH; PÉNZES; AGBANDJE-MCKENNA, 2019; TSAO *et al.*, 1991). Seu genoma consiste em aproximadamente 5kb nucleotídeos em fita simples de DNA com estruturas de *harpin* em ambas as extremidades, codificando duas *open reading frames* (ORF): A *ORF1* para proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e a *ORF2* para proteínas do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; MIETZSCH; PÉNZES; AGBANDJE-MCKENNA, 2019; PAES, 2016), como mostra a figura 1.

A *ORF1* das proteínas não estruturais (NSs), além de codificar múltiplas proteínas regulatórias da replicação viral, é uma região com altos índices de conservação, usualmente utilizada para classificação dos gêneros da família *Parvoviridae* (MIETZSCH; PÉNZES; AGBANDJE-MCKENNA, 2019). Regiões da NS1 estão relacionadas à replicação, como a de ligação do DNA, ligação de ATP, domínio da helicase e transativação (NÜESCH; ROMMELAERE, 2006). A proteína NS1 é relacionada com citotoxicidade, alterando a morfologia da célula e podendo até levar a morte celular (CORBAU *et al.*, 2000; NÜESCH; ROMMELAERE, 2006).

As proteínas de capsídeo determinam a susceptibilidade e a capacidade do vírus de ligar nos receptores das células do hospedeiro (LAMM; REZABEK, 2008). A VP2 é o componente primário para formação do capsídeo, interagindo com receptores de transferrina na superfície da célula hospedeira (HUEFFER *et al.*, 2003; HUEFFER;

PARRISH, 2003). A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina (PARKER; PARRISH, 2000).

FIGURA 1 - Esquema do capsídeo, genoma e proteínas codificadas do PVC-2.



Fonte: Adaptado do website www.viralzone.expasy.org.

O PVC-2 original se diferencia das suas primeiras variantes por 5 ou 6 nucleotídeos, enquanto o PVC-2a e PVC-2b, por apenas duas substituições de aminoácidos nas proteínas do capsídeo (Asn-426 para Asp e Ile-555 para Val) (PARRISH *et al.*, 1991). O resíduo 426 da VP2 é um sítio com grande representatividade antigênica (epítipo A) do capsídeo, sendo essa mutação um ponto de diferença do PVC-2b com o PVC-2a, VPF e o *mink enteritis virus* (MEV) (PARRISH *et al.*, 1991). Entretanto, reação cruzada entre PVC-2, VPF e MEV é constatada (EMMANUEL *et al.*, 2021; HAFENSTEIN *et al.*, 2009; PARRISH; CARMICHAEL, 1983). O PVC-2c também difere das outras variantes anteriores no resíduo 426, possuindo um glutamato (BUONAVOGLIA *et al.*, 2001).

2.2 Parvovirose canina

A parvovirose canina é uma enfermidade infectocontagiosa aguda, acometendo animais jovens com quadros gastroentéricos de vômito e diarreia sanguinolenta na maioria dos casos. O PVC-2, possui tropismo por tecidos com alta replicação celular, dentre eles o epitélio intestinal (PAES, 2016), causando alta mortalidade principalmente em animais jovens (LAMM; REZABEK, 2008). Seu pequeno genoma não codifica a

enzima DNA polimerase, necessária para replicação viral, conseqüentemente o PVC-2 só consegue se replicar em células com altas taxas de multiplicação, como tecidos embrionários, linfóides, medula óssea e pelo epitélio intestinal (PAES, 2016).

A principal porta de entrada é a oronasal, mas transmissão indireta por contato com fômites, vetores mecânicos e ambiente contaminado também é possível (BAGSHAW *et al.*, 2014; BEHDENNA *et al.*, 2019; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; GOGONE *et al.*, 2020). Ao entrar no hospedeiro, o vírus se replica no tecido gastrointestinal e linfóide, disseminando-se até o epitélio das criptas do intestino delgado e medula óssea por meio da infecção de leucócitos (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). A excreção viral pelas fezes ocorre em torno de quatro dias antes do início dos sintomas, podendo continuar por semanas após a melhora clínica (GOGONE *et al.*, 2020). O pico de concentração viral nas fezes ocorre em torno de 4 a 7 dias após infecção (JOHNSON; SMITH, 1983).

A disseminação do vírus, com seguida implementação de programas de vacinação, auxiliou na diminuição de casos, mas também contribuiu no aparecimento de variantes antigênicas pela pressão imunológica (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). Sendo um DNA vírus de fita simples, possui taxa de mutação de aproximadamente 10^{-6} , não sendo mais encontrado circulante o PVC-2 original, com atualmente 3 tipos antigênicos: PVC-2a, PVC-2b e PVC-2c (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; PAES, 2016; ZHOU *et al.*, 2017).

Quadros de êmese intensa, inapetência, leucopenia e diarreia sanguinolenta e/ou mucoide com perda de vilosidades do intestino, podendo predispor para quadros de sepse, são característicos (KILIAN *et al.*, 2018). Com a diarreia intensa e possivelmente desidratação, pode-se ocorrer choque por hipovolemia (MAZZAFERRO, 2020). O acompanhamento da leucopenia pode ser útil para avaliação de prognóstico (GODDARD *et al.*, 2008).

Apesar das diversas pesquisas em cima da enterite causada pelos PVC, não há um tratamento específico para o patógeno, sendo utilizada a base terapêutica para gastroenterites no geral, junto ao suporte clínico do animal e controle de demais sintomatologias (GODDARD; LEISEWITZ, 2010; MAZZAFERRO, 2020).

Além das problemáticas da doença aguda, já foi constatado que cães que sobreviveram de um quadro clínico de parvovirose quando filhotes, tem mais riscos de desenvolver quadros crônicos de gastroenterite ao decorrer da vida (KILIAN *et al.*, 2018).

A infecção pelo PVC-2 é importante em cenários encontrados em canis e abrigos, com sua alta morbidade, essa proximidade e grande quantidade de animais, propicia a disseminação da doença, podendo ocorrer surtos e piora dos quadros com infecções secundárias (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). Ambientes com alta concentração de animais, também podem predispor a presença de possíveis vetores mecânicos, como moscas (BAGSHAW *et al.*, 2014). Outro fator agravante da parvovirose canina, é seu perfil de prevalência em áreas com populações socioeconomicamente vulneráveis, complicando acesso ao tratamento e internação (BRADY *et al.*, 2012; KELMAN *et al.*, 2019).

O PVC-2 apresenta resistência contra a maioria dos desinfetantes comuns, sendo sensível a concentrações de formalina, halógenos e hidróxido de sódio (CAVALLI *et al.*, 2018; MCGAVIN, 1987). O desinfetante mais comum utilizado para desinfecção de ambientes veterinários é o halógeno hipoclorito de sódio, sendo eficiente para inativação do PVC-2 na concentração de 0,75% por pelo menos 1 minuto (CAVALLI *et al.*, 2018). Em temperatura ambiente pode permanecer viável por mais de 6 meses (KHATRI *et al.*, 2017).

O principal meio de prevenção e controle atual da parvovirose canina baseia-se na vacinação dos animais. As vacinas atenuadas são as mais utilizadas, sendo seguras e eficazes na indução de imunidade em cães (DAY; HORZINEK; SCHULTZ, 2010). As vacinas atuais contém PVC-2 ou sua variante PVC-2b, e já se demonstraram eficazes contra as outras variantes (LARSON; SCHULTZ, 2008). A causa mais comum de falha vacinal é relacionada com a imunidade materna quando aplicada em animais com menos de 16 semanas (DECARO *et al.*, 2005a).

Eliminação viral após a vacinação pode ocorrer e possivelmente interferir no diagnóstico, principalmente quando há ocorrência de diarreia pouco tempo após a vacinação em filhotes (DECARO *et al.*, 2007b; DECARO; BUONAVOGLIA, 2017). Porém, mesmo com o histórico vacinal recente, quando há presença de sinais clínicos característicos juntamente com um diagnóstico positivo, a maioria dos casos é devido infecção com vírus de rua (DECARO *et al.*, 2007b).

No Brasil, a ocorrência de casos e até mesmo surtos são muito comuns, podendo estar associado a baixa cobertura vacinal (ALVES *et al.*, 2018). Estudos realizados em diversos estados brasileiros, encontraram 54,3% (100/184) (ALVES *et al.*, 2018), 29,2% (42/144) (PINTO *et al.*, 2012) e 67% (67/100) (VIEIRA *et al.*, 2017) de fezes de cães sintomáticos e assintomáticos, positivos por meio de técnicas moleculares. Em outros

estudos realizados na região sul e sudeste, foram identificados 68,7% (561/817) (DEZENGRINI; WEIBLEN; FLORES, 2007) e 97,2% (311/320) (CURI *et al.*, 2016) de cães assintomáticos não vacinados com anticorpos para CPV-2. Um estudo realizado no Paraná, encontrou 14% (7/50) de amostras de fezes recolhidas de espaços públicos positivas para PVC-2 (GOGONE *et al.*, 2019).

Em relação a animais com sintomatologia característica de PVC, em estudos realizados no Brasil, foram encontrados 54% (27/50) (FONTANA *et al.*, 2013), 34,6% (36/104) (GIZZI *et al.*, 2014) e 46% (157/341) (CASTRO *et al.*, 2007) de fezes positivas para PVC, demonstrando a importância do uso de técnicas laboratoriais associado à avaliação do quadro clínico para um diagnóstico assertivo.

Usualmente a ocorrência súbita de vômito e diarreia sanguinolenta em cães jovens não vacinados, associado com leucopenia, já é sugestivo de parvovirose (PAES, 2016). Porém, somente o diagnóstico clínico não é confiável (CASTRO *et al.*, 2007; FONTANA *et al.*, 2013; GIZZI *et al.*, 2014). Estudo analisou o diagnóstico para parvovirose, baseado em avaliação clínica, comparando à diagnósticos laboratoriais diretos (reação em cadeia da polimerase e hemaglutinação), encontrou uma sensibilidade de 65,3% e 86,3%, respectivamente (DECARO *et al.*, 2013). Outros patógenos virais, como *Adenovírus canino*, *Rotavírus canino*, *Coronavírus canino* e o *vírus da Cinomose canina*, causam um quadro clínico similar, sendo necessário a realização de um diagnóstico etiológico diferencial por técnicas laboratoriais (ALVES *et al.*, 2018).

2.3 Diagnósticos disponíveis para PVC-2

Atualmente temos disponíveis diversas metodologias laboratoriais para identificação, diferenciação, quantificação e/ou isolamento viral do PVC-2 de amostras biológicas (KHATRI *et al.*, 2017). A tabela 1 compara algumas metodologias presentes na literatura para detecção e diagnóstico do PVC-2.

TABELA 1 - Comparação dos diagnósticos mais comuns para detecção do PVC-2.

Técnica	Princípio	Vantagens	Desvantagens	Referência
Microscopia Eletrônica de Transmissão	A imagem é formada por meio de um feixe de elétrons sobre o	Imagem de alta resolução.	Alto custo e demanda mão de	(BURTONBOY <i>et al.</i> , 1979)

	material a ser analisado.		obra especializada.	
Isolamento viral	Cultivo de linhagens celulares com posterior inoculação viral. Análise de efeitos citopáticos e morte celular.	Muito sensível e específico. Aumento da concentração viral.	Necessidade de mão de obra especializada. Processo demorado.	(CRANDELL; FABRICANT; NELSON-REES, 1973; KAUR <i>et al.</i> , 2015; PARTHIBAN <i>et al.</i> , 2011)
Hemaglutinação	Capacidade do vírus de aglutinar hemácias de suínos e macacos Rhesus.	Simple e possibilita titulação viral.	Necessita de mão de obra qualificada; hemácias de mamíferos frescas; e confirmação pela Inibição da Hemaglutinação.	(CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980)
PCR em tempo real	Identificação de amplificação da sequência alvo em tempo real.	Muito sensível e específico. Resultado em tempo real.	Demanda mão de obra e equipamentos de alto custo.	(DECARO <i>et al.</i> , 2005b)
Testes rápidos comerciais	ELISA e Teste imunocromatográficos. Baseiam-se na detecção de antígeno viral.	Simple, acessível e rápido.	Baixa sensibilidade e em alguns casos com altos custos.	(DECARO <i>et al.</i> , 2013; ESTHER YIP <i>et al.</i> , 2020; SCHMITZ <i>et al.</i> , 2009)

Fonte: Adaptada (KHATRI *et al.*, 2017).

Cultivo celular com linhagens de *Crandell feline kidney* (CRFK) ou *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) podem ser utilizadas para isolamento viral (CRANDELL; FABRICANT; NELSON-REES, 1973; KAUR *et al.*, 2015; PARTHIBAN *et al.*, 2011). Essa técnica se baseia na inoculação de amostras virais em cultivos previamente formados com acompanhamento para avaliação de efeitos citopáticos como alteração morfológica

e apoptose celular (PARTHIBAN *et al.*, 2011). Técnica com alta sensibilidade e especificidade, porém demorada e demanda mão de obra especializada.

A hemaglutinação pode ser utilizada para detecção direta e titulação viral, baseando-se na capacidade hemaglutinante do PVC-2 para hemácias de suínos e macaco rhesus. Para entrar nas células do hospedeiro, o vírus se liga em proteínas de transferrina na superfície celular, mas também interage com o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), um ácido siálico expressado em hemácias de mamíferos (LÖFLING *et al.*, 2014). Em contrapartida, a inibição da hemaglutinação é utilizada para titulação de anticorpos em amostras de soro. Ambos os processos não são de baixa realização, e demandam tempo e disponibilidade de hemácias de suínos frescas (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980).

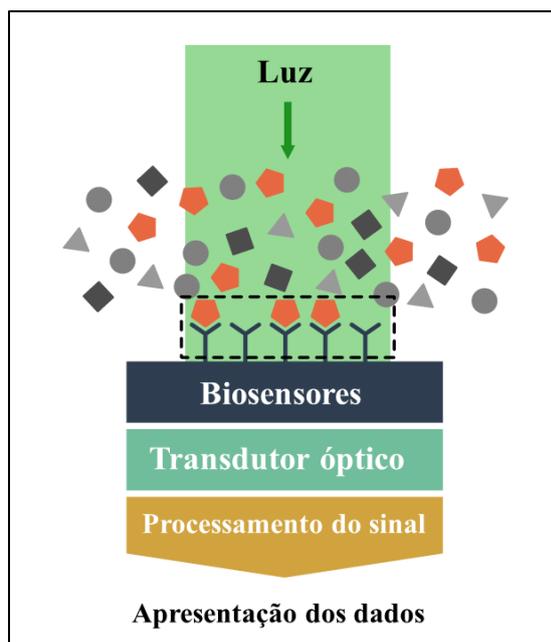
Os diagnósticos moleculares baseiam-se na amplificação de sequência do DNA viral, seja em tempo real ou após a reação por meio de leitura em gel de agarose, por meio de um par de primers específicos para uma determinada região. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR) são atualmente consideradas como técnicas de diagnóstico mais sensíveis para PVC-2 (KHATRI *et al.*, 2017).

Testes rápidos comerciais para identificação do PVC-2 em fezes estão disponíveis atualmente na rotina clínica, sendo baseados nas técnicas de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes imunocromatográficos (DECARO *et al.*, 2013; ESTHER YIP *et al.*, 2020; SCHMITZ *et al.*, 2009). Já se demonstraram eficazes na identificação de todas as variantes, mas com menor sensibilidade analítica em comparação a técnicas moleculares (ESTHER YIP *et al.*, 2020).

2.4 Biossensores e nanopartículas de ouro

A nanotecnologia vem crescendo como foco de pesquisas nas áreas da biologia e medicina desde o início do século XXI, devido a habilidade de manipular características físicas, químicas e biológicas de nanopartículas (MCNEIL, 2005). Biossensores utilizam material biológico como: enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, aptâmeros, entre outros, que ligado a um transdutor, irá transformar o alvo em um sinal elétrico, óptico, gravimétrico ou térmico, podendo ser mensurável para leitura (BASSO *et al.*, 2013; XI; YE; XIA, 2018). A figura 2 exemplifica o mecanismo de um biossensor óptico.

FIGURA 2 - Esquema básico de um sistema de biossensor óptico.



Fonte: Adaptado (BIANCHETTI, 2018).

Suas utilizações em testes diagnósticos vêm se mostrando vantajosa pela análise rápida e de amostras *in vivo* em tempo real (MALHOTRA; CHAUBEY, 2003; OU *et al.*, 2019). O material biológico a ser analisado, variando de amostras animais, ambientais, alimentícias e amostras humanas, influencia diretamente na dinâmica de ação dos biossensores (GRIESHABER *et al.*, 2008). A inserção de técnicas por meio de biossensores no mercado comercial e na área da pesquisa, ocorrerem principalmente pela praticidade, baixo custo por análise e possibilidade de detecção das mais variadas amostras de interesse (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004).

Propriedades físico-químicas únicas e dinâmicas das nanopartículas (NPs) produzidas com metais nobres, como o ouro (Au), prata (Ag), platina (Pt), ródio (Rh) e rutênio (Ru), os torna ótimos transdutores de sinais para diagnósticos em sistemas de biossensores (XI; YE; XIA, 2018). O tamanho da NP afeta diretamente a estabilidade eletroquímica e química (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013), além disso, os metais nobres são dinâmicos, possibilitando diversas vias de transdução de sinais como: ópticos (BASSO *et al.*, 2018), plasmônicos (RODRÍGUEZ-LORENZO *et al.*, 2012), eletroquímicos (SUN *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014), fluorescência (GAO *et al.*, 2015) e sinal colorimétrico (BASSO *et al.*, 2013, 2015, 2022).

A possibilidade de se ter um sinal forte, mesmo com uma baixa concentração de nanoestruturas de metais nobres, agrega ainda mais vantagens em seu uso (XI; YE; XIA, 2018). Suas superfícies permitem modificações pela ligação de tiol com a superfície do metal, com grupos funcionais como aminas e carboxilas, facilitando a manipulação com biomoléculas (como anticorpos e ácidos nucleicos) (FRATODDI, 2018; HONG *et al.*, 2005; LATHAM; WILLIAMS, 2006; RAMBUKWELLA *et al.*, 2018). Tais características vem trazendo cada vez mais atenção ao uso de NPs de metais nobres nos diagnósticos e detecção de doenças.

Outra propriedade importante que permite o uso de NPs em diferentes aplicações biomédicas, é a sua dispersão e absorção de luz na região visível pela oscilação dos elétrons livres em sua superfície, evento conhecido como ressonância de plasmon de superfície localizada (RPSL ou LSPR) (FRATODDI, 2018). Essa ressonância é afetada diretamente pelo tamanho e formato da NP, podendo ser avaliado pelo comprimento de onda da solução (FRATODDI, 2018).

A utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) como biossensores vem ganhando espaço, já sendo relatada na detecção de pesticidas, hormônios, vírus e bactérias (BASSO *et al.*, 2013, 2015, 2018, 2022; NEGAHDARI; DARVISHI; SAEEDI, 2019; OMIDFAR *et al.*, 2010; VERDOODT *et al.*, 2017). Devido suas características singulares, como a alta bio-compatibilidade, fácil funcionalização com proteínas, propriedades ópticas e eletrônicas, são ideais para produção de kits de análise (LIN *et al.*, 2013; SELVAKUMAR *et al.*, 2013; SEOW; LAI; YUNG, 2014).

Com um grama de sais ouro é possível preparar 1 litro de AuNPs, tornando a metodologia viável economicamente. A utilização de AuNPs para métodos diagnósticos já se mostrou vantajosa e eficaz, com uma combinação de baixo custo, facilidade de conjugação e propriedades ópticas singulares (BASSO *et al.*, 2013, 2018). O uso de soluções de AuNPs para detecção de biomoléculas é promissora, apresentam coloração que vai do roxo claro até o vermelho escuro, é possível a realização de análises colorimétricas a partir de mudanças na densidade da cor, de acordo com o analito analisado (OMIDFAR *et al.*, 2010). A deposição de biomoléculas nas AuNPs afetam sua ressonância, conseqüentemente seu comprimento de onda sendo possível acompanhar suas alterações pela técnica de LSPR (SMITH; CORN, 2003). Conseqüentemente, a possibilidade de detectar o parvovirus nas fezes dos animais suspeitos de infecção, para realização de um diagnóstico rápido, preciso e barato, uma vez que é eliminada uma alta carga viral por essa via, é promissora.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

O objetivo do presente estudo foi a padronização de uma técnica de detecção de parvovirus canino 2 por meio do uso de nanopartículas de ouro modificadas com a deposição de anticorpos específicos.

3.2 Específicos

- Confirmação da presença de parvovirus canino 2 nas amostras de fezes por meio da técnica de qPCR.
- Identificação das três variantes antigênicas dentre as amostras coletadas.
- Confirmação da viabilidade do anticorpo policlonal.
- Produção e caracterização das AuNPs e monocamadas.
- Caracterização da ligação dos anticorpos no complexo das AuNPs.
- Padronização da técnica de detecção com as amostras positivas para PVC-2.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 Obtenção das amostras

O total de 60 amostras foi determinado para validação da metodologia de detecção de PVC-2 com uso das AuNPs, a partir de dados da sensibilidade das AuNPs como biossensor para identificação de outros patógenos virais (BASSO *et al.*, 2015, 2018). O cálculo foi realizado com uso de uma ferramenta online (https://www.statstodo.com/SSizPrediction_Pgm.php). Os parâmetros utilizados foram: probabilidade de erro tipo 1 = 0,05; poder de 0,8; sensibilidade de 1 e 0,9.

As 60 amostras foram provenientes de parcerias com o laboratório de diagnóstico molecular veterinário (LDMVET) e do serviço de atendimento de moléstias infecciosas

(MI) do Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu. Amostras de fezes, lavado ou swab retal foram coletadas para diagnóstico de animais atendidos no serviço de MI com suspeita clínica de parvovirose, apresentando quadro de gastroenterite com diarreia sanguinolenta e mucoide, associada a leucopenia. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubo tipo Falcon de 15 mL e armazenadas a -20°C até seu processamento. Cinco amostras de fezes negativas para PCV-2, sendo duas positivas para *Giardia* spp., também foram submetidas ao protocolo. Todos os procedimentos foram aprovados sob protocolo 0163/2020 na comissão de ética na utilização de animais (CEUA).

4.2 Diagnóstico Molecular

O DNA viral foi extraído das amostras de fezes por meio de um protocolo adaptado de extração utilizando beads magnéticas (GE Healthcare Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ Carboxylate-Modified Dia.: 1 µm; 3 EDAC/PA5; 15 mL) (OBERACKER *et al.*, 2019). Inicialmente as amostras de fezes foram diluídas na proporção 1:10 em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, homogeneizadas até total diluição do material e então centrifugadas a 100 g por 2 min. O protocolo consiste em etapas de *lise*, ligação, lavagem e eluição, descritas a seguir: 1) Para a etapa de *lise* celular foi adicionado em um novo tubo de 1,5 mL 100 µL do sobrenadante da amostra diluída, 300 µL de tampão de *lise* (6M isotiocianato de guanidina [GITC]; 2% Sarkosyl; 20nM ácido etilenodiamino tetraacético [EDTA]; 50nM Tris-HCl; pH 7,6) e 10 µL de proteinase K (20mg/mL) (Promega) e homogeneizado; 2) adição de 300 µL de isopropanol 100% e 20 µL de beads magnéticas (2mg/mL) utilizando uma pipeta para homogeneização *up-down* até total diluição das beads; 3) acondicionar em rack magnética por 30 segundos ou até clarificar a solução, descartando o sobrenadante; 4) lavagem das beads magnéticas com 400 µL de isopropanol 100%; 5) realocar na rack magnética e descartar o sobrenadante; 6) duas lavagens com 400 µL de etanol 80%; 7) descartar o sobrenadante retirar todo resquício de etanol e aguardar 5 minutos com os tubos abertos para evaporar o álcool residual; 8) eluir as beads em 100 µL tampão de eluição (5 mM Tris-HCl, pH 8.5) e homogeneizar com pipeta; 9) realocar na rack magnética até clarificar e alíquotar o sobrenadante contendo o DNA da amostra em outro microtubo. Os DNAs extraídos foram armazenados em freezers -20°C até seu processamento.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi utilizada para determinar a presença de DNA viral. Para realização da qPCR foi utilizado 4 µL de DNA extraído, 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA), 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) (DECARO *et al.*, 2005b) e 4,4 µL de água livre de nucleases, totalizando 20 µL de mix. A ciclagem da reação de qPCR foi 95°C por 5 minutos, seguindo de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando com a curva de *melting*, sendo realizada no equipamento AriaMX real time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

4.3 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração, ou *Next Generation Sequencing* (NGS), foi realizado para identificação dos tipos antigênicos (PVC-2a, PVC-2b, PVC-2c) presente dentre as amostras. Sete amostras foram selecionadas levando-se em consideração a origem do animal e o período da coleta, focando em abranger cidades diversas e o período de coleta até o momento do processamento (Tabela 2).

TABELA 2 - Amostras selecionadas para NGS.

Amostra	Procedência	Animal	Data coleta	Cidade	Estado	cq
5	LDMVET	Like	17/08/2020	Niterói	RJ	8,94
8	LDMVET	Snoopy	14/09/2020	Botucatu	SP	8,16
12	LDMVET	Cristal	14/09/2020	Sorocaba	SP	11,51
20	MI	Aquiles	23/10/2020	Areiópolis	SP	7,6
21	MI	Chico	03/11/2020	Botucatu	SP	14
29	MI	Nike	15/12/2020	Anhembi	SP	9,66
30	MI	July	17/12/2020	Igarçu do Tiete	SP	7,62

cq = ciclo de quantificação

RJ = Rio de Janeiro

SP = São Paulo

As bibliotecas foram preparadas com uso do kit Illumina DNA Prep (Illumina Inc., CA, USA). Um pool de todas as amostras foi processado em cartucho *flow cell micro* de 300 ciclos no equipamento MiSeq (Illumina Inc., CA, USA). Para análise das

sequências obtidas foi utilizado o software Geneious Prime (Biomatters, Auckland, New Zealand).

4.4 Isolamento viral

Isolamento de antígeno viral em cultivo celular foi realizada para obtenção de antígeno para uso na hemaglutinação e inibição da hemaglutinação. Para isso, a manutenção de cultivo de células da linhagem Crandell oriundas de rim felino (CRFK) e da linhagem Madin-Darby oriundas de rim canino (MDCK), ambas em meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB), foi estabelecida. Três amostras de fezes positivas (A4, A6 e A8) e uma suspensão de isolado viral de PVC-2 provinda de cultivo celular (AT), foram gentilmente cedidos pelo LDMVET e pela Dra Taís Fukuta Cruz, respectivamente. As amostras de fezes e isolado viral foram diluídas em MEM na proporção 1:10000 e 1:100, respectivamente, em tubo cônico tipo Falcon estéril de 15 mL e posteriormente centrifugadas em 900g por 20 minutos. O sobrenadante foi passado para uma seringa de 5 mL e em cabine de fluxo laminar, previamente exposta a luz ultravioleta por 15 minutos, filtrado com uso de filtro de seringa estéril 0,22 μm (Sarstedt Ltd, Leicester, UK millipore).

Cinco frascos estéreis de 75 cm^3 próprias para cultivo celular foram preparadas para cada tipo celular e ao atingir 80% de confluência na monocamada, um mL de cada amostra viral filtrada foi inoculada, sendo um frasco inoculado somente com meio MEM para controle negativo. O inóculo viral filtrado foi mantido em contato direto com as células por dois minutos em constante homogeneização, posteriormente, foram adicionados 15 mL de MEM com 5% SFB. Frascos foram acompanhados diariamente para verificar o início de efeitos citopáticos por 120 horas. Para lise celular e liberação das partículas virais, as garrafas foram congeladas rapidamente a -80°C e descongeladas em temperatura ambiente, repetindo o processo 3 vezes. Após isso, a solução de células e vírus foi acondicionada em tubos tipo Falcon de 15mL e centrifugadas a 900g por 10 minutos, o sobrenadante foi separado em tubos criogênicos de 2 mL e então armazenado a -80°C . Para confirmação da replicação de partículas virais, foi coletado uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante no tempo 0h e 120h pós inoculação de todas as amostras virais.

DNA viral foi extraído com uso de protocolo utilizando Chelex® 100 (Sigma-Aldrich) (WALSH; METZGER; HIGUSHI, 2013) e qPCR realizado como já descrito.

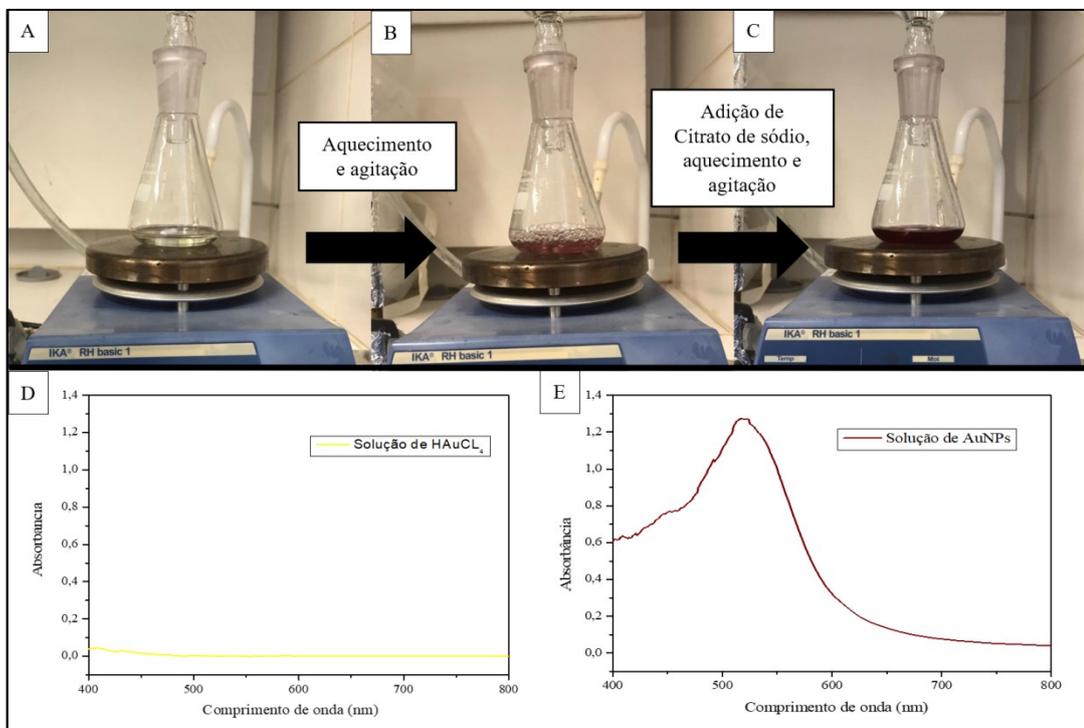
4.5 Titulação viral

Para titulação das amostras de fezes e de isolado viral foi empregada a técnica de Hemaglutinação (HA) (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980). As diluições testadas foram de 1:20 até 1:524.288, com fator de diluição na base 2.

4.6 Preparação e caracterização das nanopartículas de ouro

A síntese das nanopartículas de ouro se deu a partir de solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) (1mM), com posterior redução pelo citrato de sódio (30mM) (BASSO *et al.*, 2015, 2018). Em um Erlenmeyer de 100 mL, adicionamos 10 mL de solução de HAuCl_4 e com uso de agitador e balão, mantemos aquecimento e homogeneização até seu ponto de ebulição. Ao atingir essa etapa, 2 mL do citrato de sódio são adicionados. O citrato de sódio reduz os íons de ouro em nanopartículas de ouro metálica e o excesso de ânions do citrato na solução, mantem a superfície metálica do ouro dando uma carga negativa para cada nanopartícula. Quando a solução alcança uma coloração vermelha escuro, o aquecimento é cortado e a homogeneização continua por 5 minutos. Processo esquematizado na figura 3. Uma vez em temperatura ambiente, a solução será acondicionada em frasco âmbar.

FIGURA 3 - Imagens do processo de produção das AuNPs e espectro UV-Vis. A – Solução de HAuCl_4 diluída. B – Solução de HAuCl_4 em ebulição, etapa para adição de citrato de sódio. C – Solução de AuNPs na coloração adequada em agitação sem aquecimento. D – Gráfico da solução de HAuCl_4 não absorvendo luz. E – Solução com as nanopartículas de ouro interagindo com a luz a 520 nm.



Fonte: Arquivo próprio.

Para confirmação da síntese e avaliação de parâmetros de diâmetro e dispersão, a solução de AuNPs foram analisadas pelas técnicas: Ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) com o equipamento de UV-Visível (Biochrom Ltd, Cambridge, Inglaterra); Microscopia eletrônica de transmissão (MET) com as imagens analisadas pelo software ImageJ (versão 1.8.0_172); e por Dispersão dinâmica de luz (DLS) no equipamento Dyna PRO Titan (Wyatt Technology, Califórnia, EUA) na temperatura de 30°C com 100 aquisições de 10 segundos cada. Os dados do LSPR e DLS foram analisados nos softwares OriginPro 8.5.0 e DYNAMICS 6.10, respectivamente.

4.7 Produção e caracterização das monocamadas auto-organizadas sobre as AuNPs de ouro

Para cada mL de solução de AuNPs, foi adicionado 100 µL de 11-ácido mercaptoundecanóico (MUA) 0,018 M permanecendo em temperatura ambiente por 40 minutos. Nessa etapa, o grupamento tiol presente no MUA se liga irreversivelmente na estrutura das AuNPs.

Solução contendo 0,1 M de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e 0,05 M de N-hidroxissuccinimida (NHS) é preparada e armazenamento sob refrigeração. São adicionados 50 µL de EDC (0,1M)/NHS (0,05M) na solução de AuNPs, mantendo em incubação refrigerada overnight (~12 horas). As monocamadas auto-organizadas (SAMs) são responsáveis por intermediar a fixação dos anticorpos sob as nanopartículas de ouro, por meio da interação do seu grupo funcional não ativo com o grupo tiol da monocamada. Para caracterização das SAMs sobre as AuNPs, foram realizadas as técnicas de LSPR e MET.

4.8 Padronização da metodologia de detecção do PVC-2

Foram utilizados anticorpo monoclonal e policlonal. O anticorpo monoclonal anti-PVC-2 (ab140431; Abcam, Reino Unido) foi adquirido comercialmente, apresentado uma concentração de estoque de 2,17 mg/ml. O IgG policlonal presentes em soro hiperimmune produzido em cobaias, foi gentilmente cedido pela M.V. Msc Marcela Ribeiro. A confirmação de viabilidade e titulação foi realizada por meio da técnica de inibição da hemaglutinação (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980). A concentração estimada de globulinas, pela relação albumina/globulina e proteínas totais presentes no soro, foi de 21,7 mg/ml. A combinação de ambas as imunoglobulinas na proporção 1:1 com concentrações de uso, também foi testada.

Todas as 60 amostras positivas foram submetidas a técnica, junto de 5 amostras de fezes negativas e uma alíquota de tampão PBS. Para avaliação da especificidade do protocolo, amostras biológicas contendo circovirus suíno tipo 2 (fezes e soro de suínos),

e uma amostra de adenovírus suíno (soro) foram testadas. O circovirus suíno tipo 2 e o adenovírus suíno se assemelham ao PCV-2 pela ausência de envelope viral.

4.9 Forma de análise dos resultados

Todos os resultados foram comparados com resultados obtidos empregando-se técnicas clássicas para o diagnóstico de PVC-2, a hemaglutinação e a qPCR, sendo a segunda considerada padrão ouro.

Para análise da alteração no comprimento de onda da solução com as imunoglobulinas utilizadas e após a adição das amostras positivas e negativas, foi utilizado o Teste de Wilcoxon. A comparação dos resultados de comprimento de onda das amostras positivas e negativas foi realizada pelo Teste de Mann-Whitney. Os valores de diferença do comprimento de onda entre as imunoglobulinas e as amostras positivas foram analisados com o Teste de Friedman.

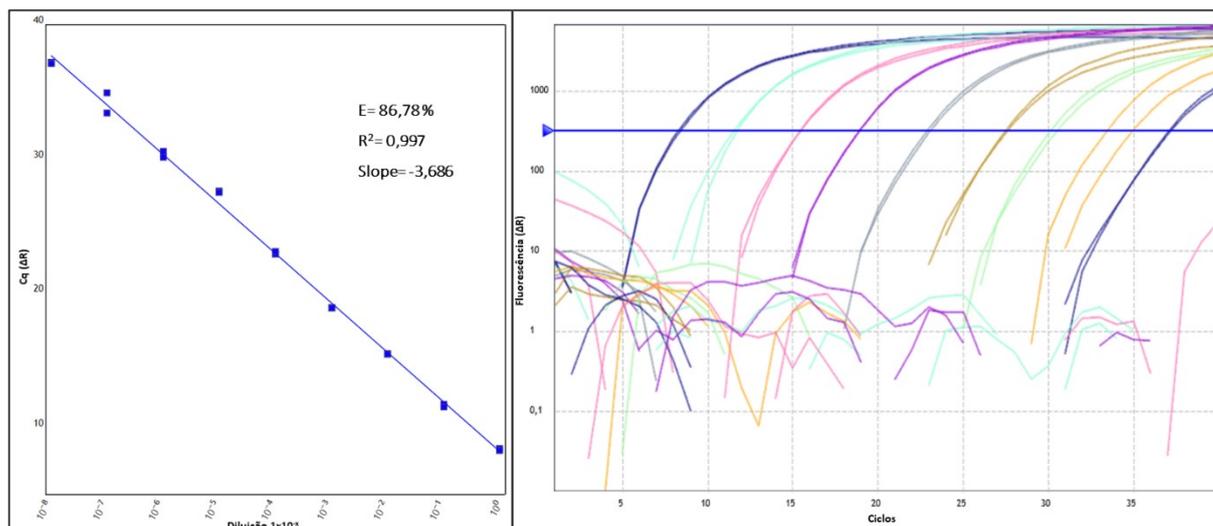
Para verificar correlação entre os resultados do qPCR e hemaglutinação o teste de correlação de Spearman foi utilizado. A correlação dos resultados de qPCR e hemaglutinação com os dados de aumento no comprimento de onda das amostras contendo o vírus, também foi realizada com o teste de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 95% no software GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico molecular e titulação viral

Para avaliação da eficiência dos primers da reação de qPCR, um controle positivo foi diluído dez vezes na base 10, e testada em duplicata (Figura 4). A eficiência de amplificação da reação de qPCR foi de 86,78%, com correlação positiva entre as replicatas ($R^2 = 0,997$) e inclinação da curva (slope) de -3,686.

FIGURA 4 - Gráfico da curva padrão de eficiência e gráfico de amplificação da reação de qPCR para PVC-2.



Todas as 60 amostras foram positivas por qPCR para PVC-2 e 49 (81,67%) apresentaram resultados positivos pela técnica de HA (Tabela 3). A mediana dos cq foi de 11,82 e das unidades hemaglutinantes (UHA) foi de 1024. Análise de correlação dos resultados da qPCR e da HA, se demonstrou significativa e negativa ($p < 0,0001$; $r = -0,78$), demonstrando uma relação inversa de quanto menor o cq, maior a UHA (figura 5). A correlação foi realizada para 49 amostras positivas em ambos os testes, e com os dados de UHA transformados em $\text{Log}_2(\text{UHA})$.

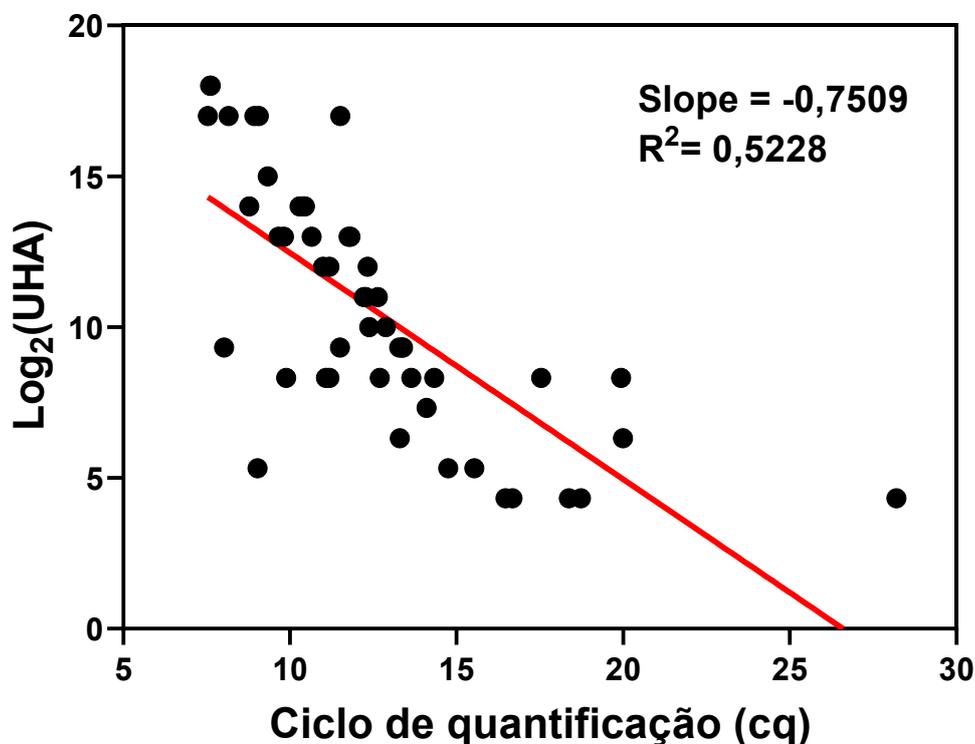
TABELA 3 - Dados de ciclo de quantificação médio e unidades hemaglutinantes das 60 amostras de fezes positivas.

Amostra	Cq Médio	UHA	Amostra	Cq Médio	UHA
1	10,38	16384	31	11,05	n
2	8,78	16384	32	9,82	8192
3	8,03	640	33	28,2	20
4	11	4096	34	14,35	n
5	8,94	131072	35	17,54	320
6	14,57	n	36	19,13	n
7	7,54	131072	37	12,4	n

8	8,16	131072	38	11,19	4096
9	9,89	320	39	14,1	160
10	12,88	1024	40	18,74	20
11	13,64	320	41	14,07	n
12	11,51	131072	42	9,34	32768
13	12,34	4096	43	19,94	320
14	12,7	320	44	11,78	n
15	9,03	40	45	14,94	n
16	11,19	320	46	11,72	n
17	13,36	640	47	10,29	16384
18	14,33	320	48	20	80
19	14,75	40	49	12,28	2048
20	7,6	262144	50	12,22	2048
21	14,01	n	51	10,45	16384
22	16,47	20	52	10,66	8192
23	16,68	20	53	12,64	2048
24	15,54	40	54	9,06	131072
25	11,76	8192	55	11,51	640
26	11,09	320	56	18,37	20
27	13,39	640	57	13,3	80
28	11,82	8192	58	12,38	1024
29	9,66	8192	59	15,54	n
30	7,62	262144	60	13,28	640

n=negativo

FIGURA 5 - Gráfico de distribuição dos resultados de Cq médio e Log₂ (UHA) das 49 amostras.



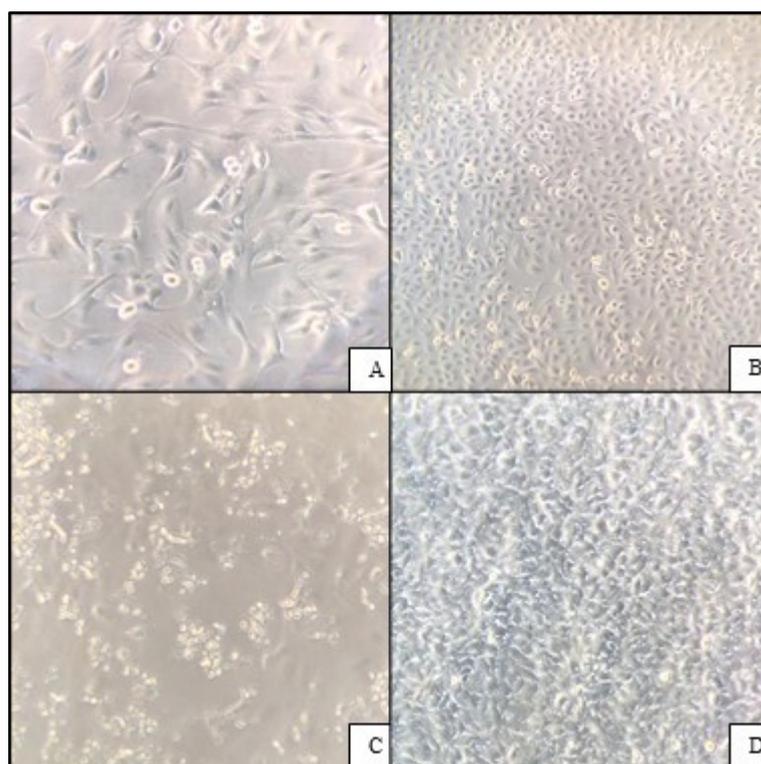
5.2 Isolamento viral

O isolamento viral por cultivo celular obteve melhores resultados com a amostra A8 em ambas as linhagens celulares (figura 6), com uma maior diferença dentre ciclo de quantificação (cq) no tempo 0 e 120 horas p.i. (tabela 4). O cultivo da amostra A4 na linhagem MDCK foi excluída, devido a defeito no frasco utilizado em seu cultivo que propiciou contaminação externa no cultivo celular.

Alíquotas das amostras A8 (CRFK e MDCK), A6 (CRFK) e A4 (CRFK) foram diluídas na base 2, e as diluições 1:2 até 1:4096 processadas pela técnica de HA, distribuídas de acordo com o mapa de placa esquematizado (figura 7). No resultado positivo vemos a aglutinação formando uma malha e a negativa um ponto de sedimentação de hemácias (figura 8). Podemos observar que algumas amostras apresentaram efeito prozona nas primeiras diluições, uma vez que com muito vírus em

solução, a superfície das hemácias fica saturada, o que interfere na formação da malha de hemácias.

FIGURA 6 - Fotos do acompanhamento do cultivo celular após inoculação das amostras virais. A – Linhagem MDCK A8 no momento da inoculação viral em aumento de 40x. B – Linhagem CRFK A8 após 24h pós inoculação viral (aumento de 20x). C – Linhagem CRFK A8 apresentando perda da confluência das células após 120 h pós inoculação (aumento de 20x). D – Controle negativo da linhagem CRFK no tempo 120 h (aumento 20x).



Fonte: Arquivo próprio.

TABELA 4- Resultado de qPCR das amostras isoladas em cultivo celular.

Linhagem celular	Amostra	Tempo (horas)	cq	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
CRFK	AT	0	n	n
		120	n	n
	A8	0	30,5	74

		120	17,35	73,5
	A6	0	36,7	74
		120	36,1	73,5
	A4	0	n	n
		120	21,1	73,5
	controle	0	n	n
		120	n	n
	AT	0	n	n
		120	31,9	73,5
	A8	0	21,6	73,5
		120	14,8	73,5
	A6	0	32,7	73,5
		120	33,2	74
	A4*	0	30,7	73,5
		120	-	-
	controle	0	n	n
		120	n	n
MDCK				

n = negativo

*Amostra excluída

FIGURA 7 - Mapa da placa utilizada na técnica hemaglutinação.

Amostra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CRFK A8 (Aliq. 1)	A	o	o	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CRFK A8 (Aliq. 2)	B	o	o	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CRFK A4 (Aliq. 1)	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRFK A6 (Aliq. 1)	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDCK A8 (Aliq. 1)	E	o	o	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MDCK A8 (Aliq. 2)	F	o	o	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MDCK A8 (Aliq. 3)	G	o	o	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Controle Negativo MDCK	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Base de diluição		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096

Fonte: Arquivo próprio.

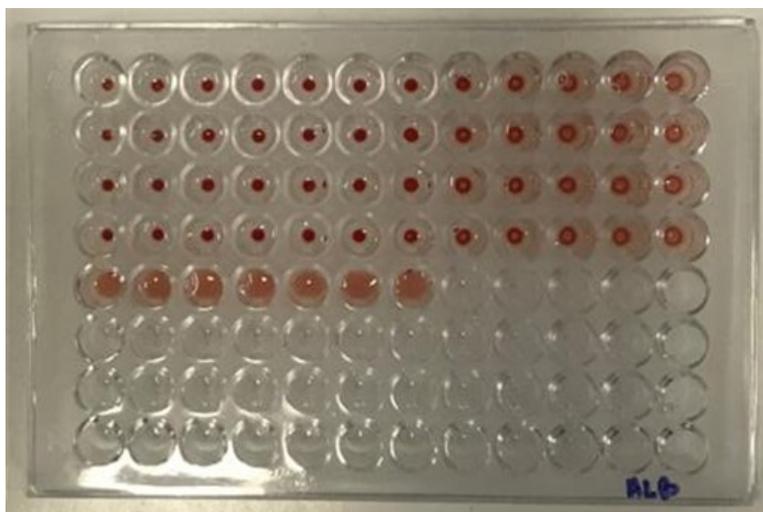
FIGURA 8 - Placa de hemaglutinação.



Fonte: Arquivo próprio.

A quantificação de partículas virais hemaglutinantes, revelou um título de 256 e 512 como uma unidade hemaglutinante (UHA). A alíquota 3 da amostra MDCK A8, com título 512, foi utilizada na técnica de HI, na concentração de 4 UH. Quatro alíquotas do IgG policlonal foram testadas nas diluições 1:2 até 1:4096 (base 2). Foi possível evidenciar que o IgG policlonal contém anticorpos funcionais, com limiar de inibição da hemaglutinação para todas as alíquotas, na oitava coluna com a diluição 1:256 (figura 9). Como utilizamos 4 UH de vírus, o título sorológico encontrado para todas as alíquotas foi de 1024.

FIGURA 9 - Placa de inibição da hemaglutinação.



Fonte: Arquivo próprio.

5.3 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento gerou dados de 11.916 até 1.572.694 *reads*, variando de 35 a 155 nucleotídeos por *read*. As *reads* foram alinhadas a uma sequência de referência do genoma completo do parvovirus canino 2, presente no GenBank sob a identificação NC_001539.1 (tabela 5).

TABELA 5 - Dados de *reads* totais e alinhados ao genoma de referência por amostra.

Amostra	Total de <i>reads</i>	<i>Reads</i> alinhadas ao genoma de referência	<i>Reads</i> do PVC-2/ Total de <i>reads</i> (%)	<i>Pairwise identity</i> (%)
5	1.250.008	146.130	11,69	99
8	11.916	6.973	58,52	97,2
12	614.856	20.248	3,29	96,4
20	581.762	25.906	4,45	95,9
21	726.832	431	0,06	93,9
29	520.928	4.319	0,83	92,8
30	1.572.694	250.664	15,94	99,1

Pela análise de códons do gene e aminoácidos da proteína VP2 das amostras, foi possível identificar a variante das sete amostras (tabela 6). A região 426 é a mais relevante para diferenciação das variantes, sendo característica da PVC-2a a presença de uma Asn, na PVC-2b uma Asp e para PVC-2c uma Glu (BUONAVOGLIA *et al.*, 2001; PARRISH *et al.*, 1991).

A região 555 representa uma área com menor relevância antigênica, primordialmente caracterizada com uma Ile na variante PVC-2a (BUONAVOGLIA *et al.*, 2001). A variante PVC-2a brasileira possui uma Val na região 555 (PÉREZ *et al.*, 2007), diferença também encontrada em outras regiões do mundo (DECARO *et al.*, 2006). Supõe-se que a substituição Ile555Val possa representar uma reversão antigênica para o PVC-2 original (MARTELLA; DECARO; BUONAVOGLIA, 2006).

TABELA 6 - Características de 15 aminoácidos da proteína VP2 e códon de seu gene das amostras sequenciadas.

Resíduos e códon	Amostras						
	PVC-2a	PVC-2b				PVC-2c	
	A20	A8	A21	A29	A30	A5	A12
164	V (GTC)	V (GTT)					
221	S (TCT)	S (TCT)	S (TCT)	S (TCT)	S (TCT)	S (TCC)	S (TCT)
232 (ATA)	I	I	I	I	I	I	I
267 (TTT)	F	F	F	F	F	F	F
297 (AAT)	N	N	N	N	N	N	N
300 (GGT)	G	G	G	G	G	G	G
305 (TAT)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
323 (AAC)	N	N	N	N	N	N	N
375 (GAT)	D	D	D	D	D	D	D
426	N (AAT)	D (GAT)	D (GAT)	D (GAT)	D (GAT)	E (GAG)	E (GAG)
440 (ACA)	T	T	T	T	T	T	T
555 (GTA)	V	V	-	V	V	V	V
564 (AGT)	S	S	-	S	S	S	S
568 (GGT)	G	G	-	G	G	G	G
570 (AAA)	K	K	-	K	K	K	K

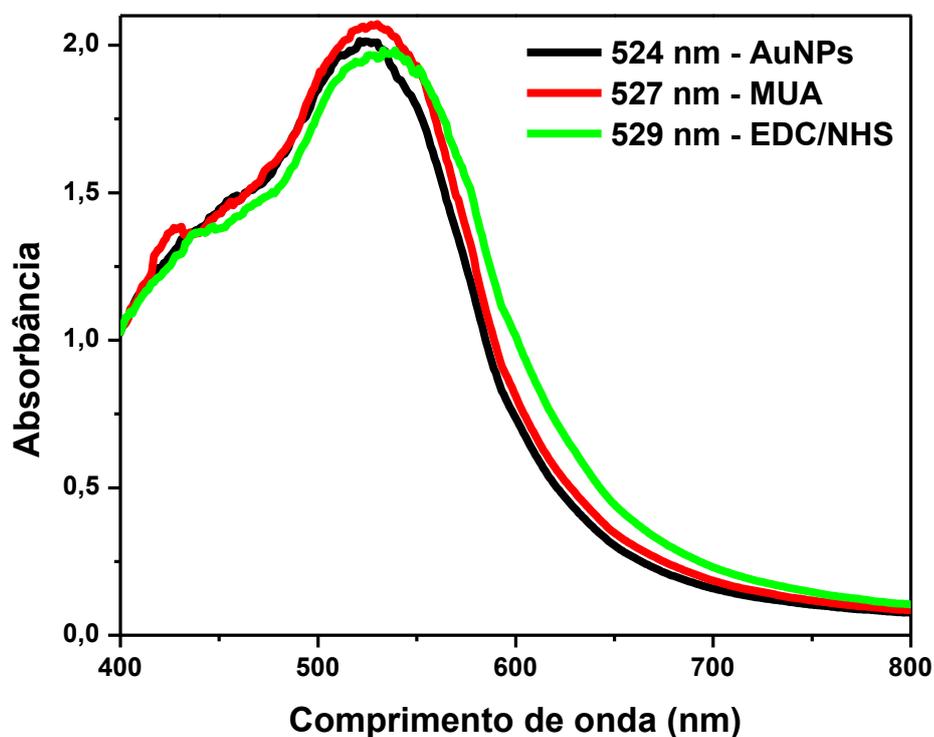
Não foi identificada nas amostras da variante PVC-2b, mutação no resíduo 570 (A-G), característica da cepa vacinal (PINTO *et al.*, 2012), com exceção da amostra 21,

que não foi possível identificar os últimos 36 aa de sua sequência do VP2. Os resultados evidenciaram a presença das três variantes de PVC-2 dentre as amostras a serem testadas pela metodologia proposta.

5.4 Síntese das AuNPs e formação do complexo

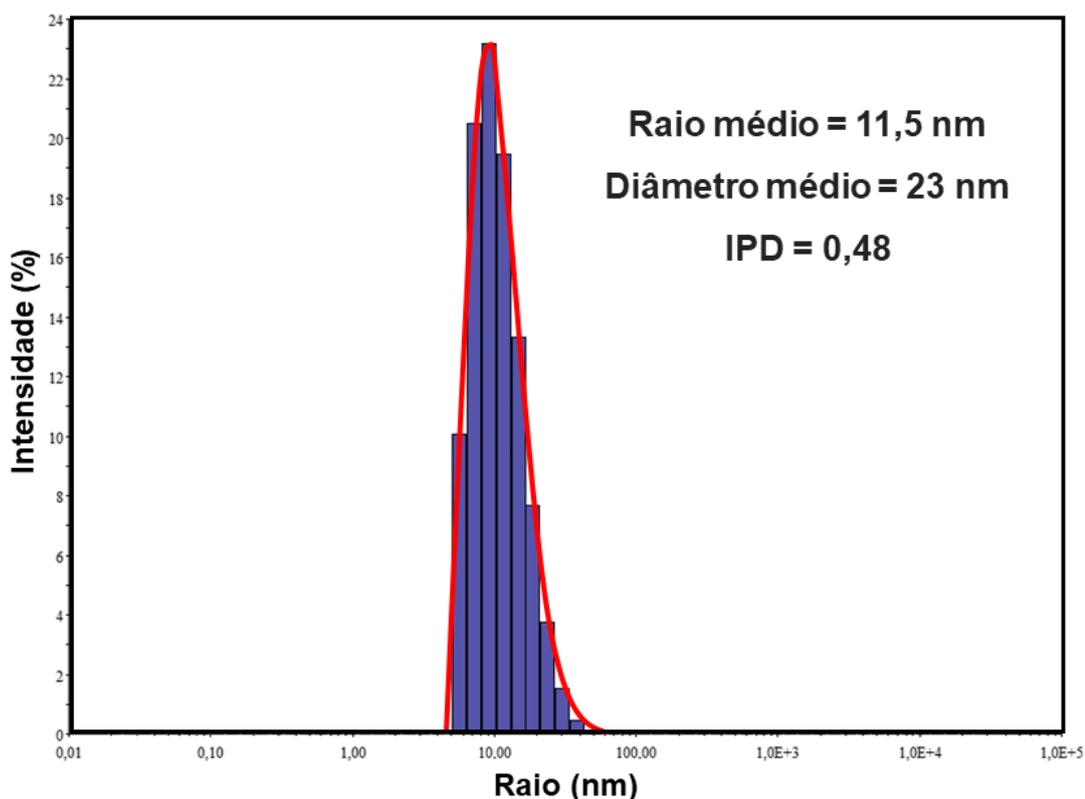
A síntese das AuNPs foi um sucesso. Na figura 10 podemos observar um pico de comprimento de onda das AuNPs em 524nm, como já descrito em outros estudos (BASSO *et al.*, 2015, 2019; VERDOODT *et al.*, 2017). Ainda no gráfico presente na figura 10, temos o espectro de absorção das etapas de modificação, evidenciando o deslocamento do pico de comprimento de onda entre cada etapa. Com adição do MUA, temos a formação das monocamadas auto-organizadas com comprimento de onda 527 nm e após adição de EDC/NHS formação dos grupos N-hidroxissuccinimida com pico de comprimento de onda em 529 nm, revelando que há cada modificação o padrão de absorção de luz pela nanopartícula de ouro se alterou.

FIGURA 10 – Gráfico do espectro UV-Vis das AuNPs e monocamadas auto-organizadas.



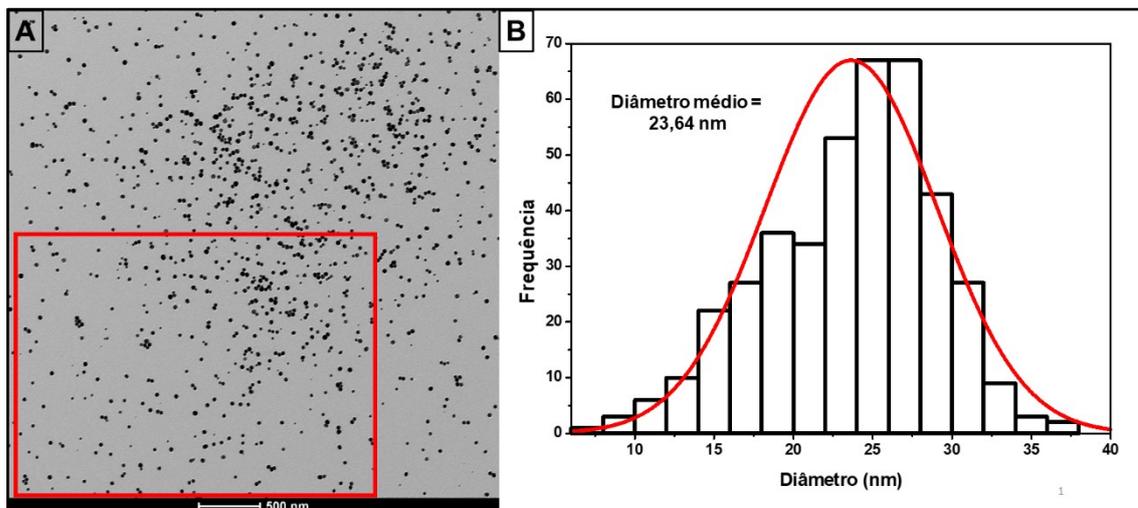
A síntese também se mostrou adequada pela análise por DLS. Na figura 11 podemos observar que as AuNPs apresentaram um raio e diâmetro médio de 11,5 e 23 nm, respectivamente, com índice de polidispersão (IPD) de 0,48. O IPD representa a heterogeneidade de tamanhos dentro de uma amostra, sendo que quanto maior o índice maior é a variação de tamanhos. Trabalhos anteriores encontraram IPD similares em experimentos com AuNPs (GHOSH *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2018)

FIGURA 11 - Análise de tamanho e índice de polidispersão por DLS das AuNPs.



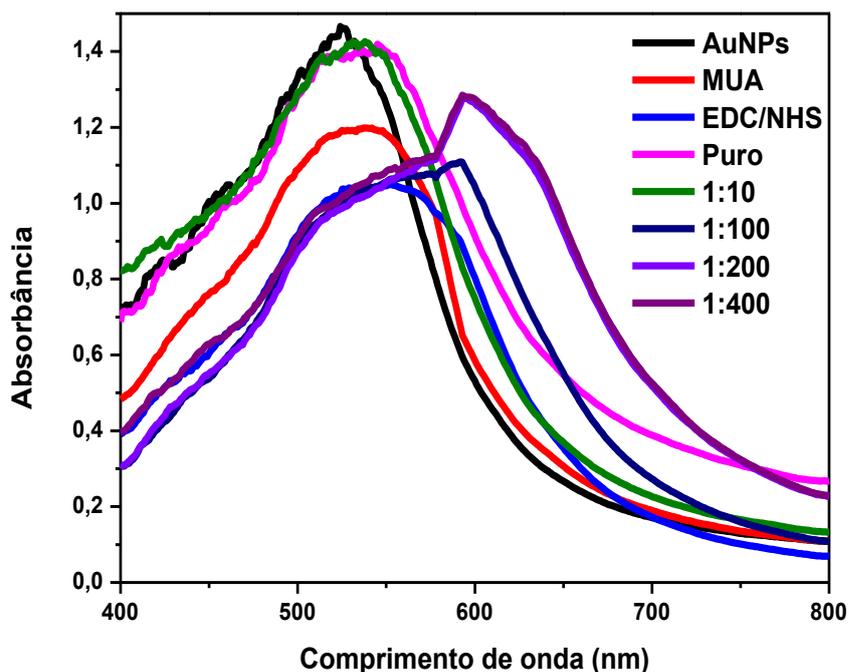
Análise das imagens da MET corrobora com os resultados encontrados na espectrofotometria e pelo o DLS, no sucesso de síntese e diâmetro das AuNPs, respectivamente. Na figura 12, é possível observar a imagem da MET e histograma de distribuição de diâmetros das AuNPs, com diâmetro médio de 23,64 nm \pm 5,41 nm, concordando com o valor encontrado pelo DLS de 23 nm.

FIGURA 12 - Análise das AuNPs pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro das AuNPs.



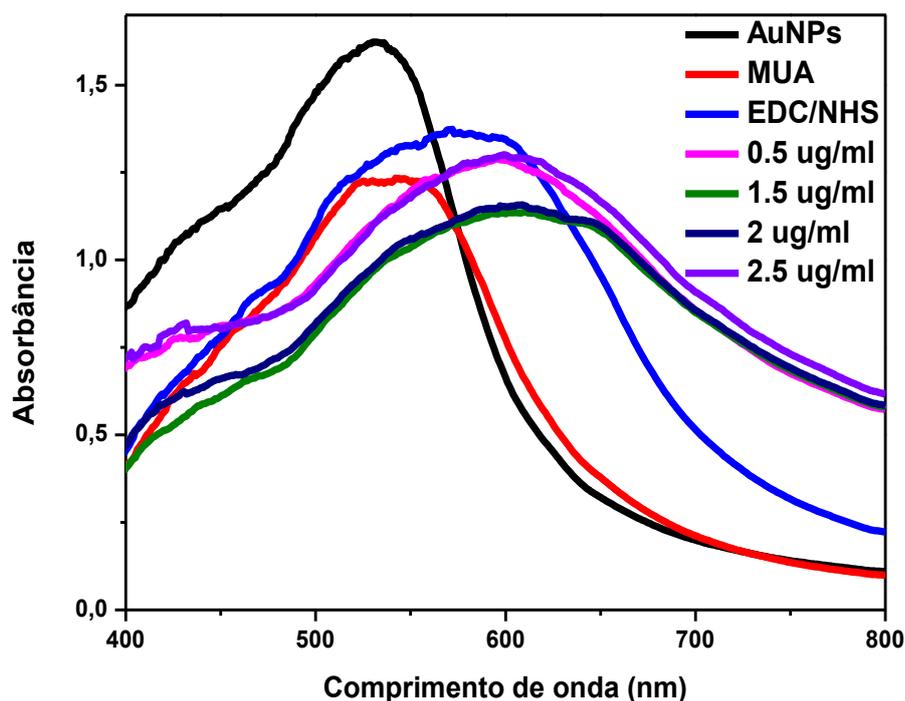
Análises da ligação de ambas as imunoglobulinas, monoclonal e policlonal, também foram confirmadas. A ligação das aminas dos anticorpos policlonais presentes no IgG policlonal, com o grupamento N-hidroxissuccinimida foi testada com o IgG policlonal puro e diluído 1:10, 1:100, 1:200 e 1:400 em PBS. A diluição 1:100 foi a com melhores resultados, apresentando um aumento do comprimento de onda em relação a etapa de EDC/NHS com menor ruído, como mostra o gráfico presente na figura 13.

FIGURA 13 - Gráfico do espectro de UV-vis do experimento com diferentes diluições (Puro, 1:10, 1:100, 1:200 e 1:400) do anticorpo policlonal em PBS.



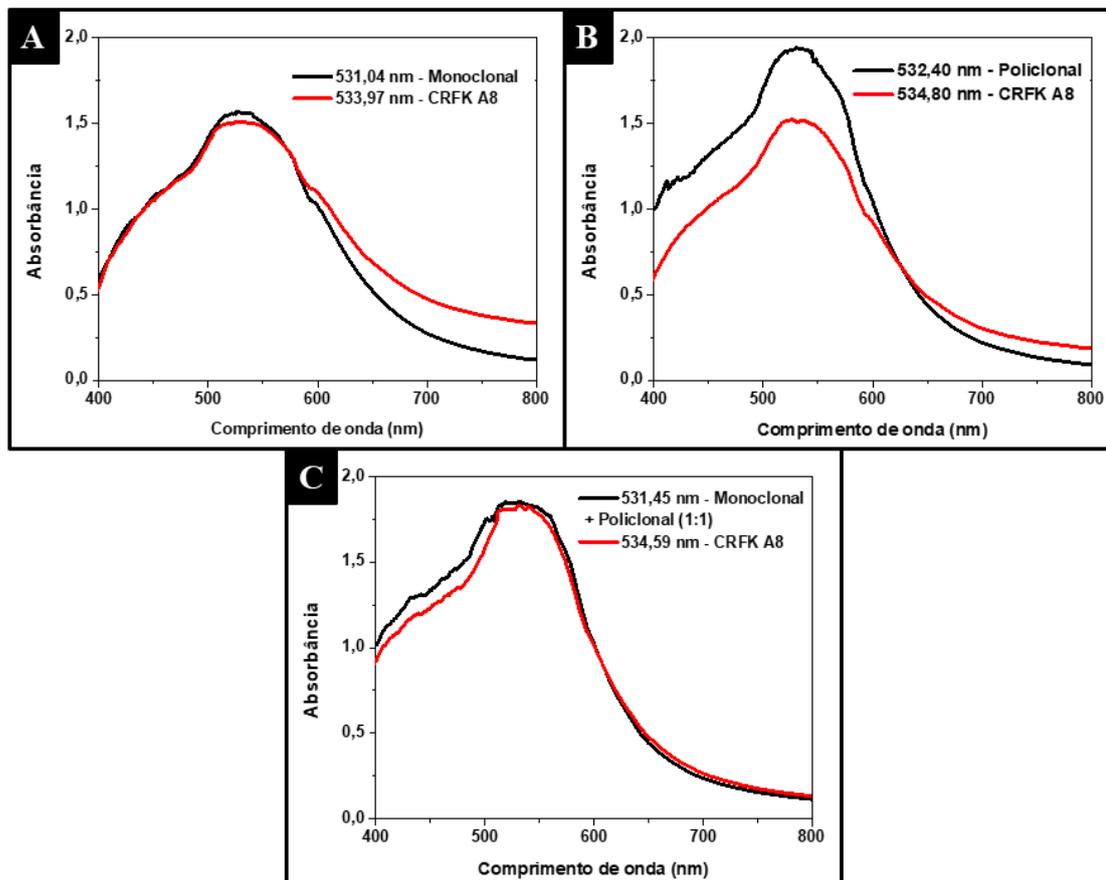
As concentrações de 0,5; 1,5; 2 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da imunoglobulina monoclonal foram testadas, e pela análise de comprimento de onda, foi constatado que todas apresentaram ligação nas monocamadas auto-organizadas, como mostra a figura 14. A concentração que apresentou maior diferença entre o comprimento de onda da etapa do EDC/NHS foi a 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, utilizada então nos demais experimentos.

FIGURA 14 – Gráfico do espectro de UV-vis do experimento com diferentes concentrações (0,5; 1,5; 2 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do anticorpo monoclonal em diluído em PBS.



Testes iniciais com a imunoglobulina monoclonal a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, policlonal diluída 1:100 e a combinação híbrida na proporção 1:1 de ambas, foram realizados com uma amostra de cultivo celular (CRFK A8). Na figura 15, é possível observar um leve aumento de comprimento de onda após a adição da amostra de cultivo celular. Com uso da imunoglobulina monoclonal obteve-se um aumento de 531,04 nm para 533,97 nm após a adição da CRFK A8, com a policlonal um aumento de 532,40 nm para 534,80 nm e com a combinação híbrida de ambas, de 531,45 nm para 534,59 nm.

FIGURA 15 - Análise de comprimento de onda e absorvância das imunoglobulinas e amostra de cultivo celular CRFK A8. A – Gráfico do UV-Vis da imunoglobulina monoclonal e amostra CRFK A8. B – Gráfico do UV-Vis da imunoglobulina policlonal e amostra CRFK A8. C – Gráfico do UV-Vis da combinação das imunoglobulinas monoclonal e policlonal, e após a adição da amostra CRFK A8.

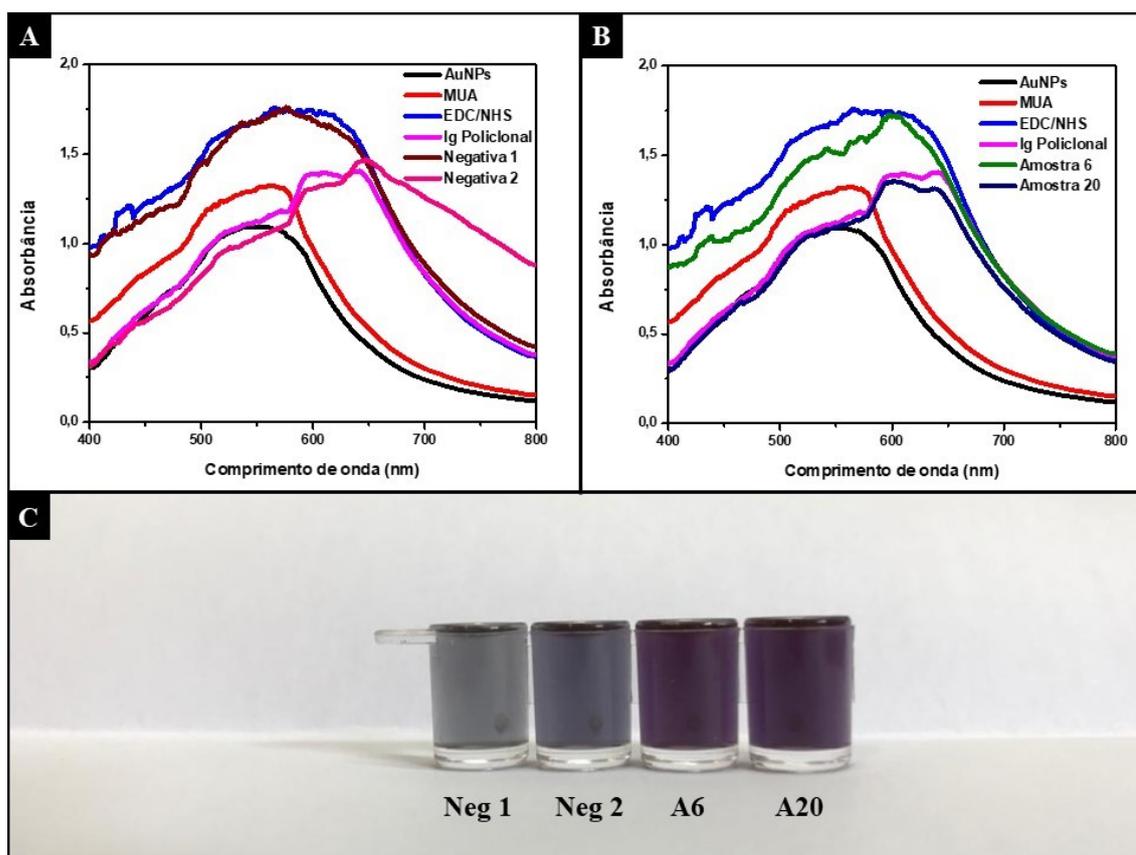


5.5 Padronização com amostras biológicas

Amostras de fezes positivas para PVC-2 foram testadas junto a amostras de fezes negativas para PVC-2, porém positivas para *Giardia* spp. Foi evidenciado que as amostras negativas para PVC-2 e positivas para *Giardia* spp. na diluição 1:10 estavam levando a mudança de cor da solução de AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas. Na figura 6, é possível observar nos quadrantes A e B gráficos do UV-Vis com complexo utilizando o anticorpo policlonal. Em ambos os gráficos temos um aumento no comprimento de onda, porém, está mais discrepante no quadrante A com as amostras negativas para PVC-2. No quadrante C, temos a mudança de cor da solução de AuNPs para cinza quando

adicionado as amostras negativas, diferente das positivas para PVC-2, que apresentaram a coloração próxima do roxo.

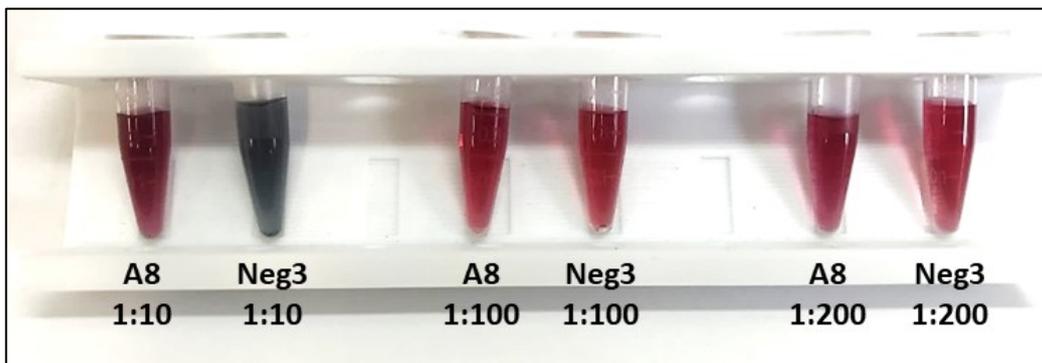
FIGURA 16 - Gráficos de absorbância e comprimento de onda de amostras de fezes e imagem da mudança de cor da solução. A - Gráfico das amostras negativas para PVC-2 e positivas para *Giardia* spp. B - Gráfico das amostras positivas para PVC-2. C - Imagem da mudança de cor da solução nas amostras positivas para *Giardia* spp. e negativas para PVC-2.



Fonte: Arquivo próprio.

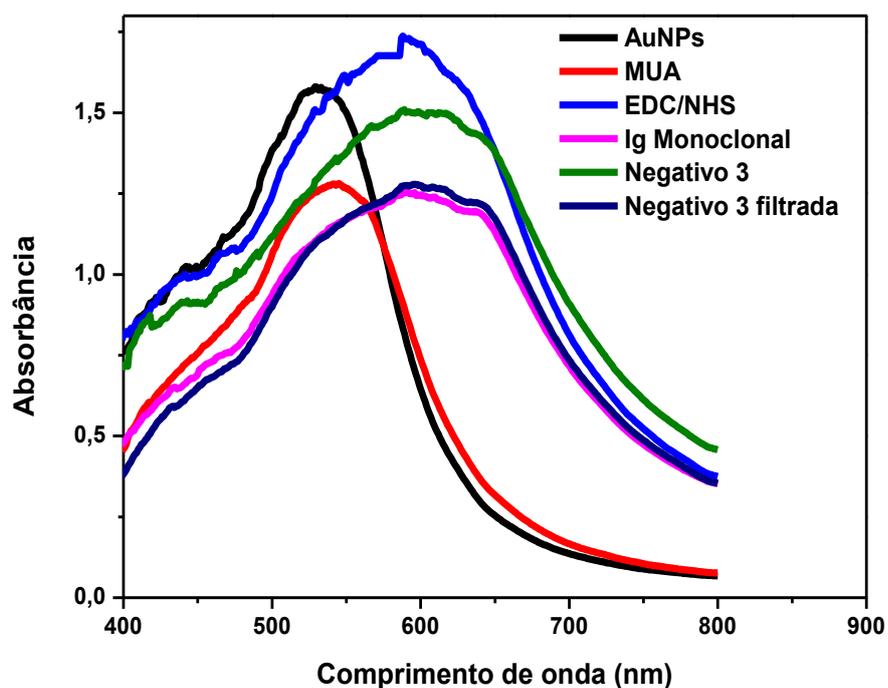
Testes com amostras negativas para PVC-2, com a imunoglobulina monoclonal, evidenciaram que as negativas também estão interagindo com o complexo e levando a alteração da cor da solução. Na figura 17 é possível observar a comparação de coloração entre a amostra positiva 8 e negativa 3 em três diluições. Para excluir possíveis reações inespecíficas do anticorpo com bactérias e/ou proteínas presentes nas fezes, testamos filtrar com filtro de seringa 0,22 μm uma amostra. Na figura 18, podemos observar que independente da filtração da amostra negativa 3 na diluição 1:10, ainda temos um deslocamento de comprimento de onda e consequente alteração de cor da solução.

FIGURA 17 - Análise da mudança da coloração da solução de AuNPs com amostra 8 positiva e 3 negativa, nas diluições 1:10, 1:100 e 1:200.



Fonte: Arquivo próprio.

FIGURA 18 - Gráfico do espectro de UV-vis da análise do comprimento de onda entre a amostra negativa 3 diluída 1:10, filtrada e não filtrada com filtro de seringa 0,22 μ m.



Algo presente nas amostras de fezes negativas interage com as AuNPs, levando a sua agregação e conseqüentemente mudança de cor da solução e deslocamento do comprimento de onda. Os dois principais fatores que interferem na estabilidade das AuNPs são o equilíbrio entre as forças eletrostáticas repulsiva e as forças atrativas de van der Waals (ALDEWACHI *et al.*, 2018; MARIN; NIKOLIC; VIDIC, 2021). Esse equilíbrio pode ser influenciado por diversos fatores, mas os dois mais relevantes compreendem o pH da solução e a força iônica.

O pH da solução influencia diretamente na carga da superfície das AuNPs, com o aumento do pH, temos OH^- em excesso levando a diminuição do potencial zeta propiciando a agregação das AuNPs (BASSO *et al.*, 2020a; KUMAR; YOON; KIM, 2009; MARIN; NIKOLIC; VIDIC, 2021). Medimos valores de pH das amostras positivas e negativas antes e após a adição na solução contendo as AuNPs. As soluções de AuNPs, AuNPs@MUA@EDC/NHS e após adição da imunoglobulina, mantiveram seu pH em 5,5. Após a adição das amostras positivas e negativas, todas as alíquotas mantiveram o pH 5,8 como mostra a tabela 7, excluindo o pH como limitante nessa situação.

TABELA 7 - Valores de pH das amostras positivas e negativas antes e após adição na solução com as AuNPs.

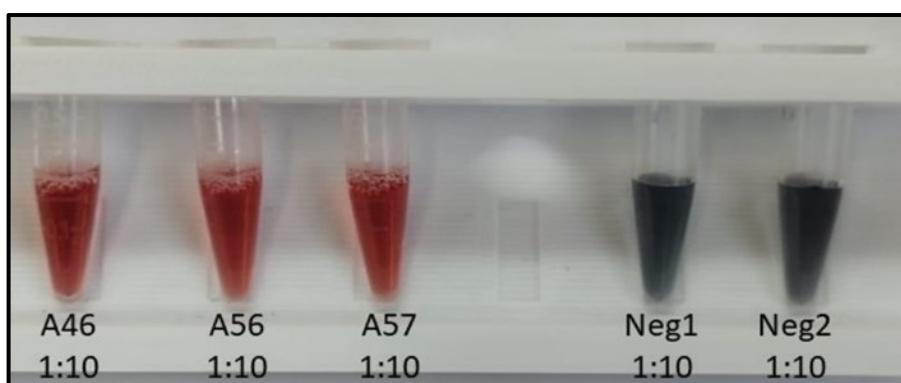
Amostra	pH	
	Amostra diluída 1:100 em PBS	AuNPs + amostra
10	7	5,8
58	7	5,8
38	7	5,8
47	7	5,8
34	7	5,8
Negativa 1	7	5,8
Negativa 2	7	5,8
Negativa 3	7	5,8

A força iônica da solução também pode influenciar na agregação das AuNPs, sendo que sais como MgSO_4 e NaCl podem neutralizar a força repulsiva entre elas, perturbando o equilíbrio de forças e gerando uma agregação (KIM *et al.*, 2017; LEDLOD *et al.*, 2020). As fezes são uma das principais vias de excreção de eletrólitos do organismo, e em quadros de diarreia, como os que ocorrem na parvovirose canina, podemos ter a perda excessiva desses íons pelas fezes (TELLO; PEREZ-FREYTES, 2017). Para verificar se as amostras de fezes influenciam na agregação das AuNPs, adicionamos 50 μL de amostras positivas e negativas na diluição 1:10, em 400 μL de solução das nanopartículas sem a formação do complexo. Escolhemos realizar o teste na solução contendo somente as AuNPs sem a formação do complexo, devido à sua instabilidade

pela ausência da monocamada auto-organizada nas nanopartículas (ALDEWACHI *et al.*, 2018).

Na figura 19, podemos observar que as amostras positivas para PVC-2 mantiveram a coloração avermelhada característica das AuNPs, enquanto as amostras negativas mudaram em questão de segundos para uma coloração cinza, sugerindo que houve agregação entre as nanopartículas.

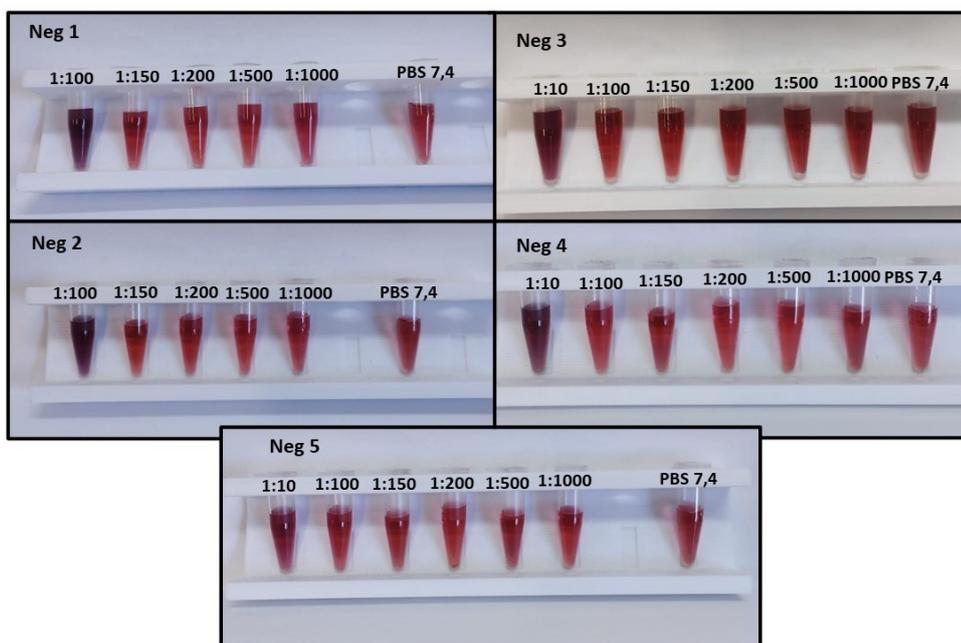
FIGURA 19 - Teste de adição de amostras positivas (A46, A56 e A57) e negativas (Neg1 e Neg2) para PVC-2 diretamente na solução de AuNPs sem formação do complexo.



Fonte: Arquivo próprio.

Supõe-se que as fezes não diarreicas negativas, mesmo diluídas na proporção 1:10 em PBS, possuam uma concentração de sais que induz a agregação das nanopartículas. As amostras de fezes negativas, sendo duas positivas para *Giardia* spp. (Negativas 1 e 2) e três negativas para ambos patógenos (Negativas 3, 4 e 5), foram diluídas em PBS (pH 7,4) nas proporções 1:10, 1:100, 1:150, 1:200, 1:500 e 1:1000 para verificar até qual diluição ocorre essa agregação inespecífica. Na figura 20, podemos observar que todas as amostras negativas a partir da diluição 1:150, não induziram a agregação das AuNPs (sem o complexo), permanecendo avermelhada a cor da solução.

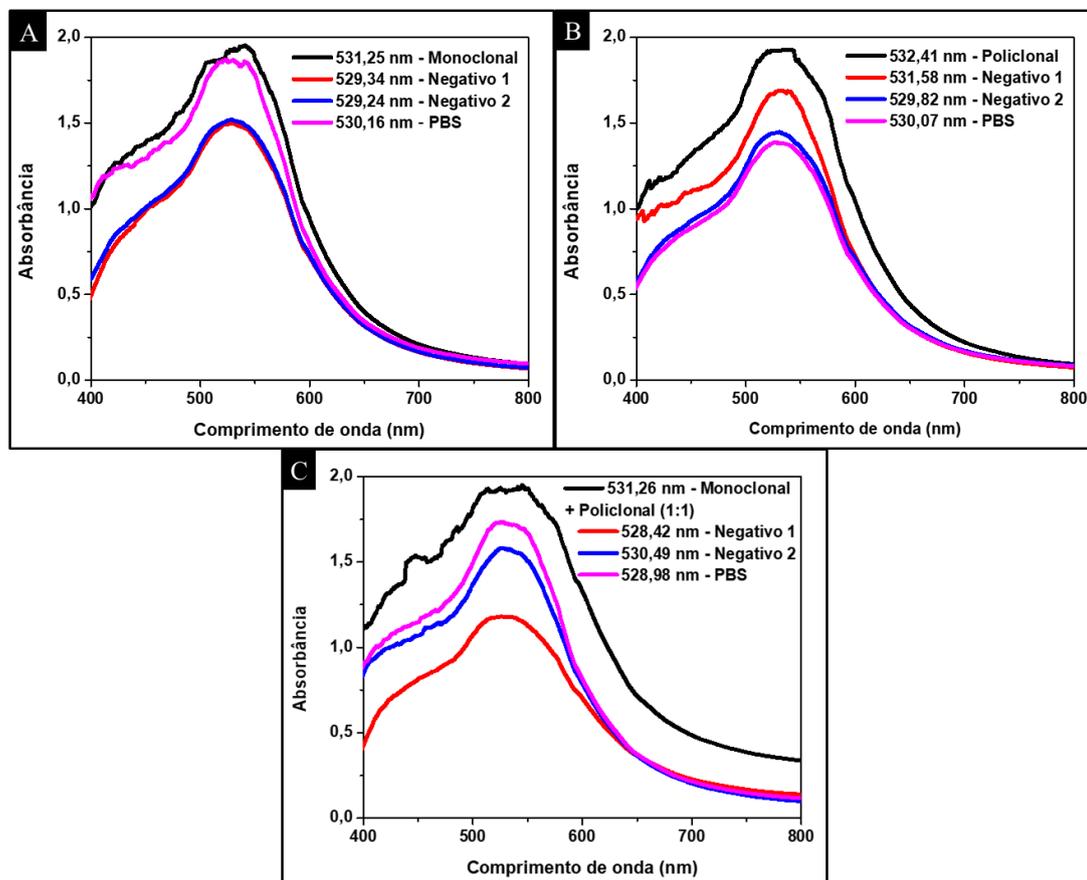
FIGURA 20 – Avaliação de agregação das AuNPs e consequente mudança de cor da solução, com diferentes diluições de amostras negativas (Neg1 a 5) para PVC-2 (Negativas 1 a 5).



Fonte: Arquivo próprio.

Como a diluição 1:150 das amostras negativas visualmente não induziu a agregação das AuNPs sem complexo, para confirmação, teste com amostras negativas 1 e 2 e PBS foi realizado com AuNPs com complexo e ligação das imunoglobulinas. Na figura 21, temos gráficos de análise de comprimento de onda de solução das AuNPs com formação do complexo e com posterior adição das amostras negativas diluídas na proporção 1:150. Podemos observar que tanto com o anticorpo monoclonal, policlonal e a junção de ambos, não temos aumento de comprimento de onda após a adição das amostras negativas, confirmando que na diluição 1:150 não ocorre ligação ou agregação inespecífica. Com isso, os experimentos com todas as amostras positivas e negativas foi realizado com a diluição 1:150 em PBS.

FIGURA 21 - Análise de comprimento de onda da solução de AuNPs com formação de complexo e diferentes anticorpos, antes e após a adição das amostras negativas (1 e 2) diluídas na proporção 1:150. A - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal (2,5 µg/ml). B - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo policlonal (1:100). C - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal e policlonal (1:1).

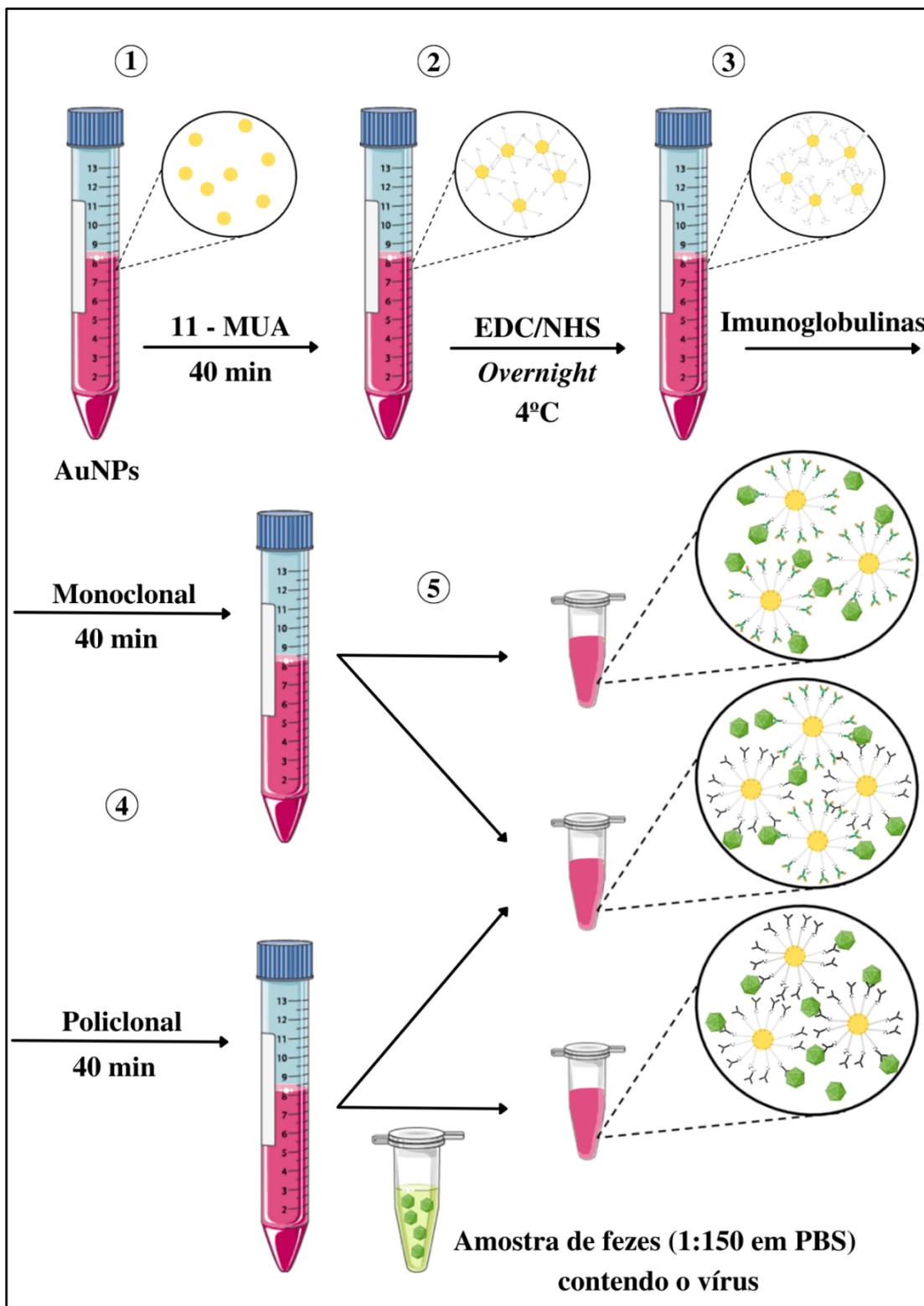


5.6 Experimentos com as amostras

As 60 amostras de fezes positivas e 5 negativas para PVC-2 foram submetidas ao protocolo com os anticorpos monoclonal e policlonal, e uma combinação de ambos na proporção 1:1. Os experimentos foram realizados como demonstrado na figura 22: 1) Adição de 11 – MUA na solução de AuNPs com incubação de 40 minutos para ligação do grupo tiol; 2) Adição de EDC/NHS e formação das monocamadas auto-organizadas com período overnight de incubação sob refrigeração; 3) Separação da solução em dois tubos tipo falcon para adição das imunoglobulinas monoclonal e policlonal com incubação de 40 minutos; 4) Aliquotagem de 400 µL das soluções monoclonal e policlonal em microtubos e outra sequência com 200 µL de cada para gerar a combinação de ambas as imunoglobulinas (proporção 1:1); 5) por final, adição de 40 uL das amostras

de fezes na diluição 1:150, permanecendo em incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, para então, leitura no UV-Visível.

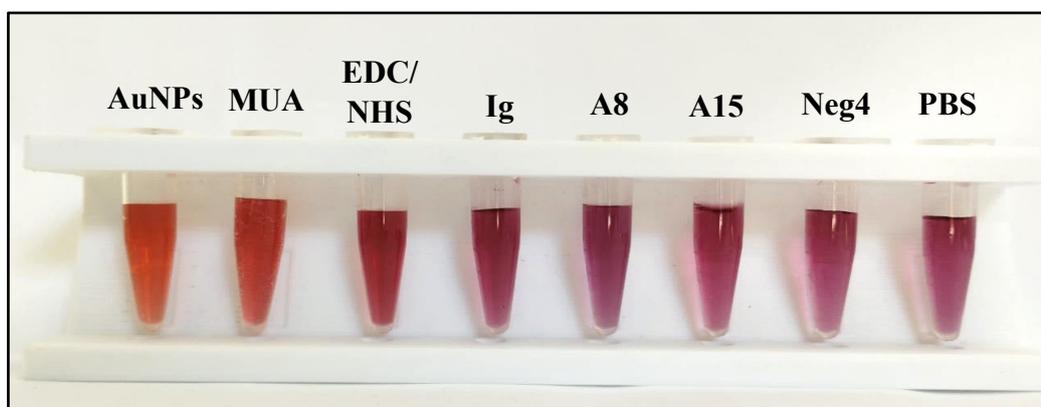
FIGURA 22 – Fluxograma do preparo e realização dos experimentos.



Fonte: Arquivo próprio.

Na figura 23 temos a comparação de coloração da solução em cada etapa. Independente da imunoglobulina utilizada, as amostras positivas não apresentaram alteração de cor significativa da solução em comparação a etapa do anticorpo. Alteração já relatada em metodologias similares utilizando as AuNPs como biossensores (BASSO *et al.*, 2015; MORTEZAEI *et al.*, 2021; MRADULA *et al.*, 2020). Recentemente nosso grupo de pesquisa obteve êxito ao utilizar um híbrido de nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3) com as de ouro para diagnóstico visual de circovirus suíno tipo 2 (BASSO *et al.*, 2022).

FIGURA 23 - Imagem de comparação da coloração da solução contendo as AuNPs, após adição do MUA, do EDC/NHS, da imunoglobulina híbrida, das amostras positivas A8 e A15, da negativa 4 e com adição de PBS.



Fonte: Arquivo próprio.

Entretanto, pelas análises no equipamento de espectrofotometria de UV-Vis é possível observar que houve ligação viral no complexo das AuNPs pelo aumento no comprimento de onda das amostras positivas, como mostra a figura 24. Resultados similares foram encontrados em experimentos anteriores realizado pelo nosso grupo de pesquisa para detecção do vírus da dengue com uso das AuNPs (BASSO *et al.*, 2018). Na tabela 7, temos os valores de comprimento de onda das amostras positivas e negativas, e respectivas diferenças em comparação a etapa do anticorpo.

TABELA 7 – Valores do comprimento de onda das amostras positivas (1 ao 60) e negativas (1 a 5 e PBS) para as imunoglobulinas monoclonal, policlonal e a combinação de ambas.

Amostra	Monoclonal (2,5ug/mL)		Policlonal (1:100)		Monoclonal + Policlonal (1:1)	
	Comprimento de onda (nm)	Diferença* (nm)	Comprimento de onda (nm)	Diferença* (nm)	Comprimento de onda (nm)	Diferença* (nm)
1	533,55	2,57	535,19	2,01	535,01	2,96
2	534,37	3,39	540,14	6,96	537,02	4,97
3	538,4	7,42	538,57	5,39	545,71	13,66
4	534,37	3,39	535,56	2,38	537,38	5,33
5*	533,57	2,59	540,22	7,04	537,4	5,35
6	535,56	4,58	538,4	5,22	538,57	6,52
7	537,94	6,96	536,01	2,83	541,96	9,91
8 [†]	537,21	6,23	536,93	3,75	540,95	8,9
9	546,17	15,18	543,33	9,97	536,9	5,01
10	534,37	3,02	535,17	2,76	533,5	2,24
11	533	2,01	537,39	4,03	542,15	10,26
12*	547,82	16,83	535,56	2,2	545,35	13,46
13	533,91	2,92	536,38	3,02	539,95	8,06
14	533,54	2,19	534,67	2,26	533,35	2,09
15	539,95	8,96	535,37	2,01	544,89	13
16	541,14	10,15	538,76	5,4	543,43	11,54
17	540,13	9,14	540,22	6,86	541,96	10,07
18	541,96	10,97	535,74	2,38	546,17	14,28
19	536,93	5,58	536,34	3,93	534,92	3,66
20°	550,83	19,48	542,79	9,61	541,23	8,51
21 [†]	540,22	8,87	540,04	6,86	537,57	4,85
22	552,85	21,5	537,85	4,67	539,77	7,05
23	536,02	4,67	536,59	4,18	536,59	5,33
24	536,57	5,22	541,96	8,78	539,95	7,23
25	535,74	4,39	537,75	4,57	542,96	10,24
26	533,54	2,19	534,44	2,03	534,08	2,82

27	533,36	2,01	538,26	5,85	537,43	6,17
28	535,19	3,84	536,57	3,39	550,02	17,3
29 [†]	541,23	9,88	536,93	3,75	538,21	5,49
30 [†]	534,31	3,27	534,56	2,07	535,07	3,62
31	533,43	2,39	534,56	2,07	539,22	7,77
32	534,41	3,37	535,69	3,2	536,58	5,13
33	535,69	4,65	535,29	2,8	539,72	8,27
34	542,15	10,8	538,58	5,4	541,14	8,42
35	540,41	9,06	540,22	7,24	543,52	10,16
36	533,36	2,01	538,12	5,14	537,75	4,39
37	545,97	14,62	541,23	8,25	536,93	3,57
38	536,2	4,85	538,58	5,6	536,29	2,93
39	540,59	9,24	536,02	3,04	536,29	2,93
40	534	2,65	535,56	2,58	537,02	3,66
41	538,46	7,42	535,06	2,57	534,69	3,24
42	536,03	4,68	537,75	4,77	544,98	11,62
43	534,36	3,01	537,57	4,59	536,29	2,93
44	534,37	3,38	535,19	2,47	533,91	2,56
45	533,55	2,56	535,19	2,47	534,39	3,04
46	537,02	6,03	535,02	2,3	535,17	3,82
47	533,55	2,56	535,69	2,97	536,32	4,97
48	535,56	4,57	535,36	2,64	535,89	4,54
49	533,36	2,37	535,74	3,02	533,79	2,44
50	533,18	2,19	535,24	2,52	534,82	3,47
51	535,38	4,39	534,74	2,02	534,66	3,31
52	533,3	2,13	534,73	2,64	536,06	3,05
53	533,69	2,52	535,35	3,26	536,77	3,76
54	535,83	4,66	535,02	2,93	537,88	4,87
55	539,64	8,47	535,43	3,34	539,65	6,64
56	539,91	8,74	535,88	3,79	539,21	6,2
57	539,89	8,72	535,51	3,42	539,6	6,59
58	537,32	6,15	537,74	5,65	535,06	2,05
59	534,45	3,28	534,93	2,84	535,48	2,47

60	533,43	2,39	534,56	2,26	535,08	4,03
Neg 1	529,34	-2,01	531,58	-0,83	528,42	-2,84
Neg 2	529,24	-2,11	529,82	-2,59	530,49	-0,77
Neg 3	529,91	-1,13	531,89	-0,6	530,79	-0,66
Neg 4	528,78	-2,26	531,77	-0,72	529,28	-2,17
Neg 5	531,02	-0,02	530,79	-1,7	530,16	-1,29
PBS	530,16	-1,19	530,07	-2,34	528,98	-2,28

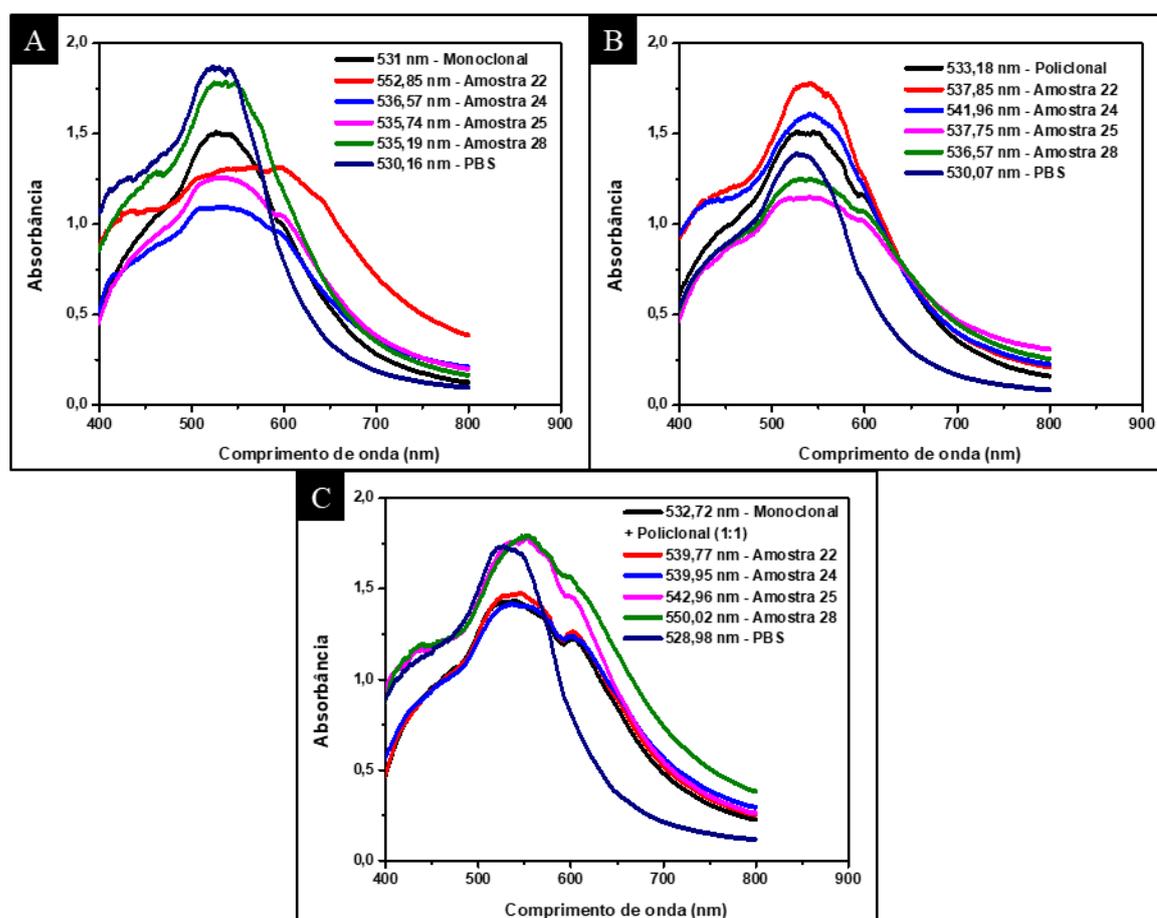
*Diferença de comprimento de onda em relação a respectivos valores do comprimento de onda da etapa de anticorpo.

° PVC-2a

† PVC-2b

• PVC-2c

FIGURA 24 - Análise do comprimento de onda da solução de AuNPs com diferentes anticorpos e após a adição de amostras positivas (22, 24, 25 e 28) e PBS. A - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal (2,5 µg/ml). B - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo policlonal (1:100). C - Gráfico da solução de AuNPs com anticorpo monoclonal e policlonal (1:1).

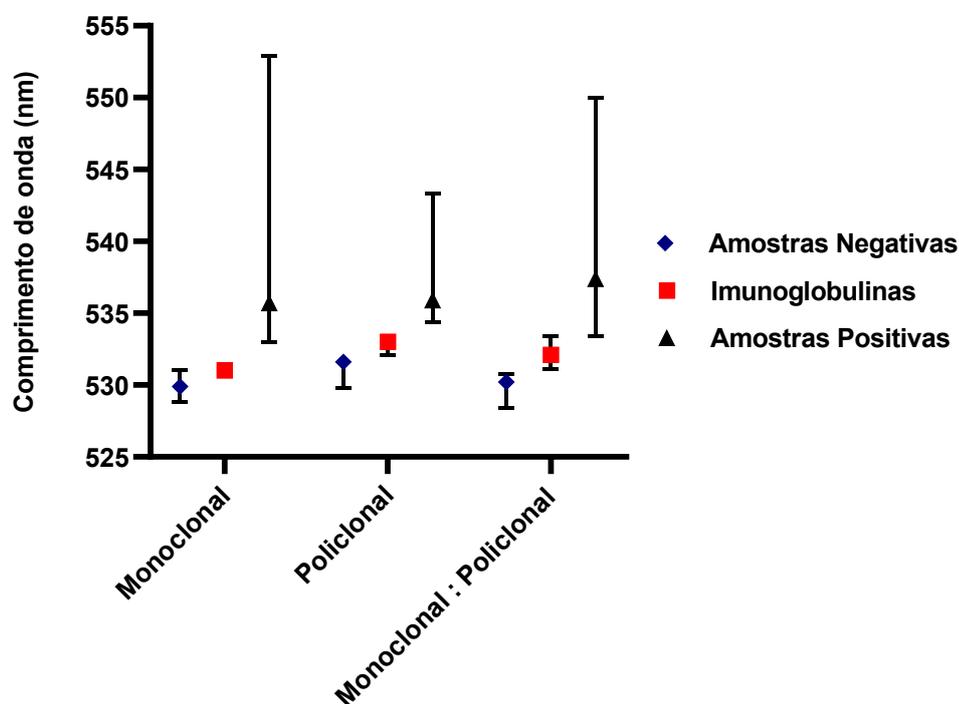


Em relação a detecção das três variantes antigênicas (PVC-2a, PVC-2b e PVC-2c), o protocolo também funcionou. Dentre as três variantes PVC-2a (A20), PVC-2b (A8, A21, A29 e A30) e PVC-2c (A5 e A12), todas apresentaram aumento em seus comprimentos de onda em comparação as respectivas etapas de imunoglobulinas, como apresentado na tabela 7.

A mediana do comprimento de onda após a ligação do anticorpo monoclonal no complexo foi de 531,1 (530,98 - 531,35 nm), o policlonal apresentou uma mediana de 533 nm (532,09 - 533,36) e a combinação de ambos na proporção 1:1 apresentou uma mediana 532,1 nm (531,05 - 533,36). O comprimento de onda após adição das amostras positivas e incubação, apresentaram uma mediana de 535,7 nm (Q1 533,7; Q3 539,9) com uso da imunoglobulina monoclonal, com a policlonal a mediana ficou em 535,9 nm (Q1 535,2; Q2 538,2) e a combinação de ambas apresentou a maior mediana, com 537,4 nm (Q1 535,2; Q2 540,7).

Em relação a adição das amostras negativas no complexo com o anticorpo monoclonal, o comprimento de onda mediano das amostras foi de 529,9 nm (528,8 – 531), com o policlonal 531,6 nm (529,8 – 531,9) e com o uso da combinação de ambos apresentou uma mediana de 530,2 nm (528,4 – 530,8). Na figura 25, é possível observar a comparação entre o comprimento de onda da etapa com as imunoglobulinas e após a adição das amostras positivas e negativas. Independentemente do tipo de anticorpo, todos apresentaram ligação do vírus no complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulina.

FIGURA 25 - Gráfico da comparação entre medianas e limites superior e inferior do comprimento de onda das imunoglobulinas (monoclonal, policlonal e combinação de ambas [1:1]), amostras negativas e positivas.

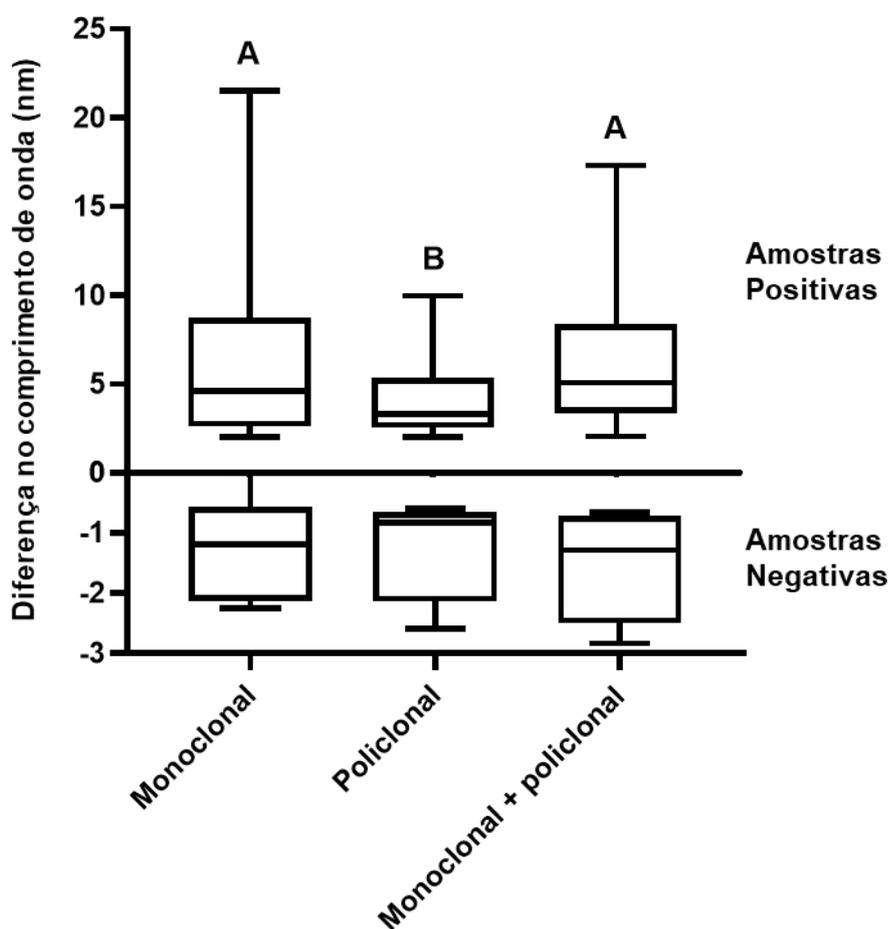


A diferença entre o comprimento de onda da etapa com as imunoglobulinas e após a adição das amostras positivas, apresentou um aumento mediano de 4,62 nm ($p < 0,0001$) para o uso do anticorpo monoclonal, 3,3 nm ($p < 0,0001$) com o policlonal, e com a combinação de ambos um aumento mediano de 5,07 nm ($p < 0,0001$). Os três grupos apresentaram um aumento estatisticamente significativo no comprimento de onda em relação a etapa anterior, sendo que a combinação híbrida do monoclonal com o policlonal obteve a maior diferença. Na figura 26 temos a comparação dos três grupos. O uso dos anticorpos monoclonal e a combinação do monoclonal com policlonal, apresentaram uma diferença estatisticamente maior, em comparação ao policlonal ($p = 0,014$ e $p = 0,0002$, respectivamente). Não houve diferença estatística entre o uso do anticorpo monoclonal e a combinação de ambos ($p = 0,706$).

Com as amostras negativas, não houve aumento do comprimento de onda em relação a etapa AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulina para todos os grupos, como mostrado na figura 26. Com o anticorpo monoclonal a diferença mediana foi de -1,19 nm ($p = 0,0625$), com o policlonal -0,83 nm ($p = 0,0625$) e a combinação híbrida de ambos de -1,29 nm ($p = 0,0625$). Não houve diferença estatística significativa entre os

comprimentos de onda das amostras negativas com as imunoglobulinas. Indêpende do anticorpo, todas as amostras negativas apresentaram um comprimento de onda inferior em relação ao da etapa anterior, resultados semelhantes ao encontrado em estudos anteriores (BASSO *et al.*, 2013, 2018, 2020b). A diferença entre as medianas do comprimento de onda das amostras positivas e negativas, se mostrou estatisticamente significativa com o $p < 0,0001$, para todos os anticorpos (monoclonal, policlonal e a combinação híbrida).

FIGURA 26 - Comparação entre a diferença do comprimento de onda das etapas com as imunoglobulinas monoclonal, policlonal e a combinação de ambas, e após a adição das amostras positivas e negativas.



Apesar da ausência de modificação significativa da cor da solução das AuNPs, através da técnica de espectrofotometria, foi possível confirmar que a ligação antígeno-anticorpo estava ocorrendo no complexo pelo aumento no comprimento de onda. A análise pela MET corrobora com os resultados do UV-Visível. Na figura 27, podemos observar um aumento no diâmetro médio das AuNPs, previamente de 23,64 nm, para

29,24 nm após a formação do complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas. Com a adição da amostra positiva A8, foi constatado um aumento no diâmetro médio para 32,73 nm, como é possível observar pela análise presente na figura 28. Resultados similares aos encontrados em experimentos anteriores (BASSO *et al.*, 2022; RETH, 2013), demonstrando aumento no diâmetro das AuNPs a partir da deposição de biomoléculas.

FIGURA 27 - Análise do complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro do complexo.

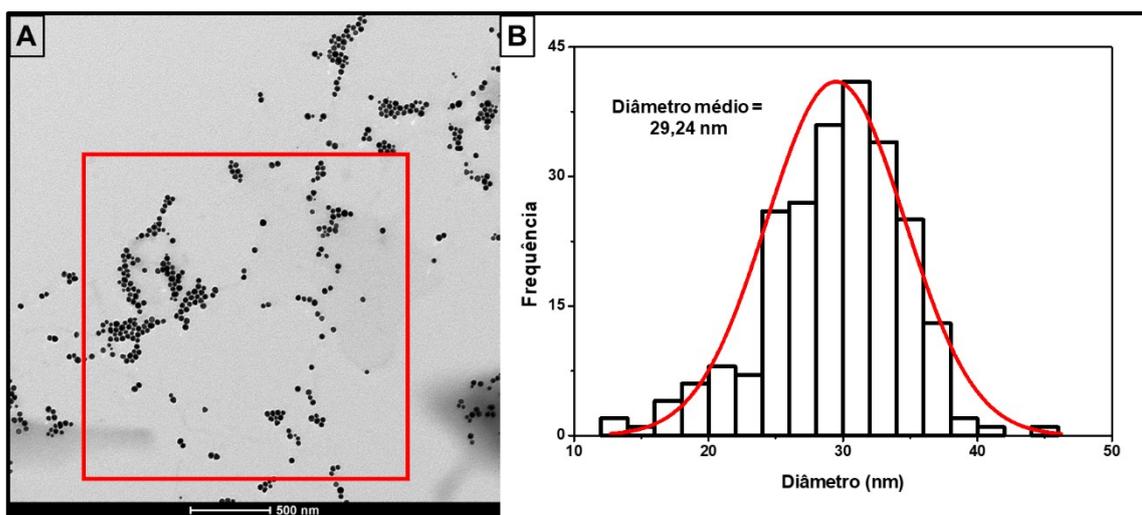
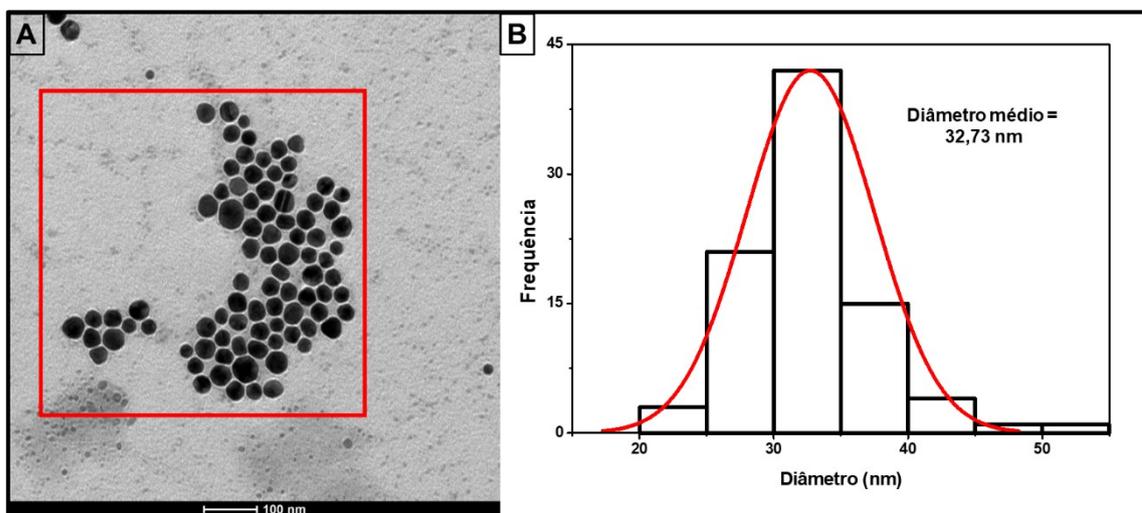


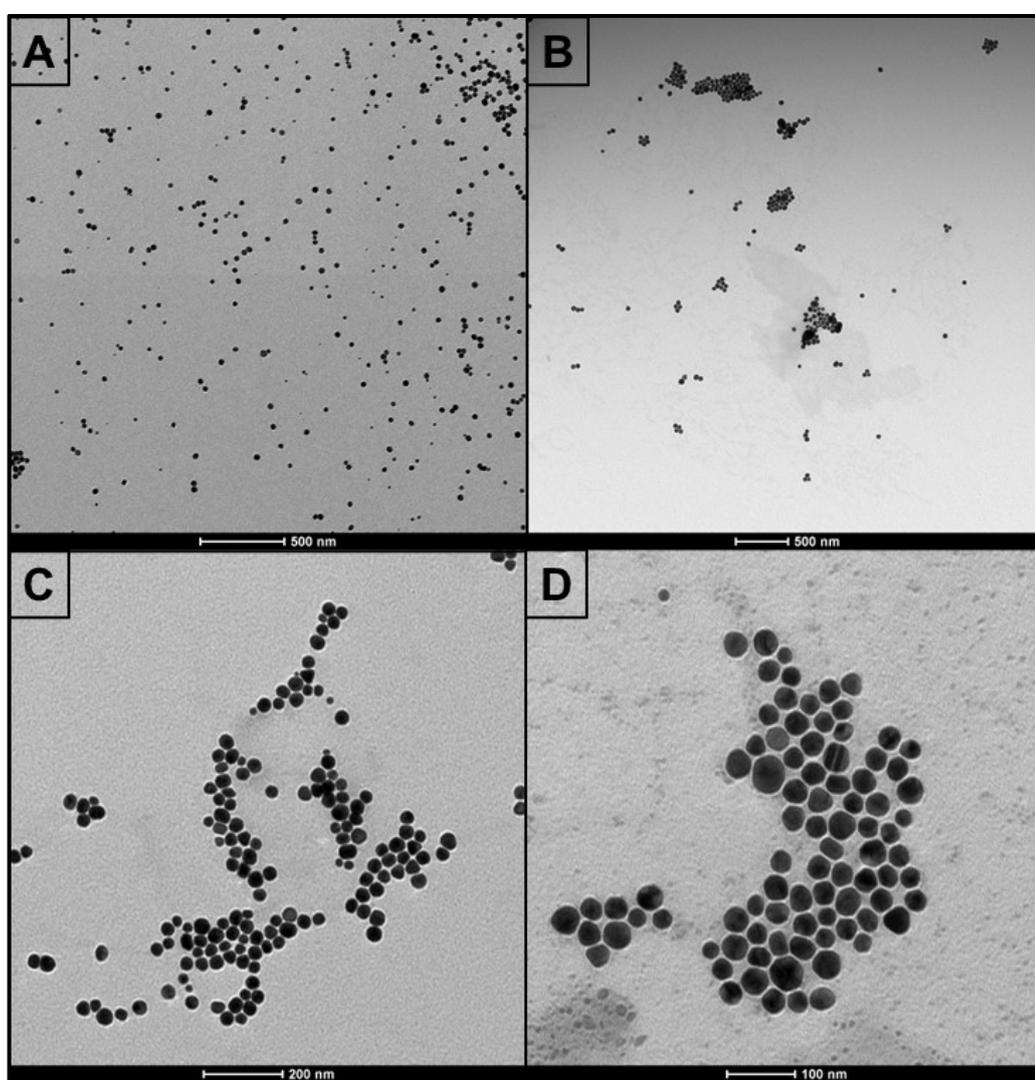
FIGURA 28 - Análise do complexo após adição de amostra positiva A8 pela MET. A - Imagem da MET. B - Histograma da distribuição de diâmetro do complexo mais amostra A8.



Na figura 29 temos imagens da MET, onde podemos observar no quadrante A as AuNPs em escala de 500 nm com um tamanho uniforme e dispersas. Nos quadrantes B temos a formação da monocamada ao redor das AuNPs e no quadrante C o complexo

com a ligação da combinação dos anticorpos monoclonal e policlonal. No quadrante D temos a adição da amostra positiva A8, sendo possível observar uma sutil sombra ao redor das AuNPs e um aumento nos agregados de nanopartículas. Resultados semelhantes a estudos prévios com AuNPs (BASSO *et al.*, 2022; MRADULA *et al.*, 2020).

FIGURA 29 - Fotos da MET. A - AuNPs em escala de 500nm com aproximadamente 23 nm de diâmetro. B – Etapa da formação do complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS. C – Após a adição da combinação dos anticorpos monoclonal e policlonal formando o complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas. D – Solução após adição da amostra positiva (A8), formando o complexo AuNPs@MUA@EDC/NHS@Imunoglobulinas@parvovirus.



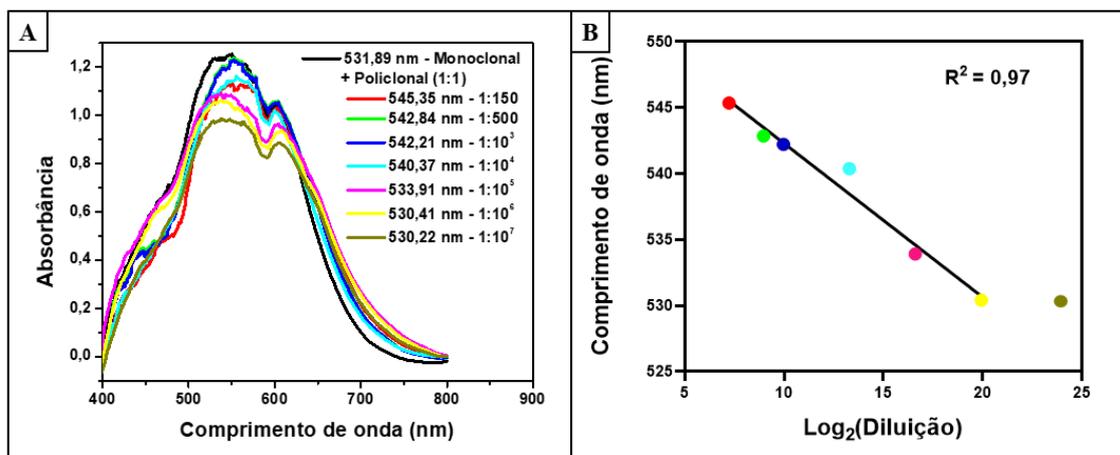
Fonte: Arquivo próprio.

A combinação híbrida de ambos os anticorpos monoclonal e policlonal, apresentou os melhores resultados com a maior mediana de comprimento de onda, por essa razão, foi escolhido para comparação dos resultados. A análise de correlação dos

resultados de qPCR, diagnóstico padrão ouro para PVC-2, e dos comprimentos de onda das amostras positivas não foram significativas ($p=0,45$). Em relação a análise das 49 amostras que apresentaram título hemaglutinante, não foi observado uma correlação estatisticamente significativa dos valores de Log_2 HA com os de comprimento de onda ($p=0,92$). Resultados indicam que os valores de comprimento de onda para nosso protocolo não são extrapolados de forma quantitativa, somente qualitativa (positivo ou negativo), diferente dos resultados de qPCR e HA.

Para identificar o limiar de detecção diluímos a amostra positiva A12 nas proporções 1:150, 1:500, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶ e 1:10⁷ (figura 30). No quadrante A é possível observar um aumento no comprimento de onda até a diluição 1:10⁵ com 2,02 nm em relação a etapa contendo a combinação do anticorpo monoclonal e policlinal. No quadrante B temos a comparação dos valores de comprimento de onda com o Log_2 das respectivas diluições, com um R^2 de 0,97.

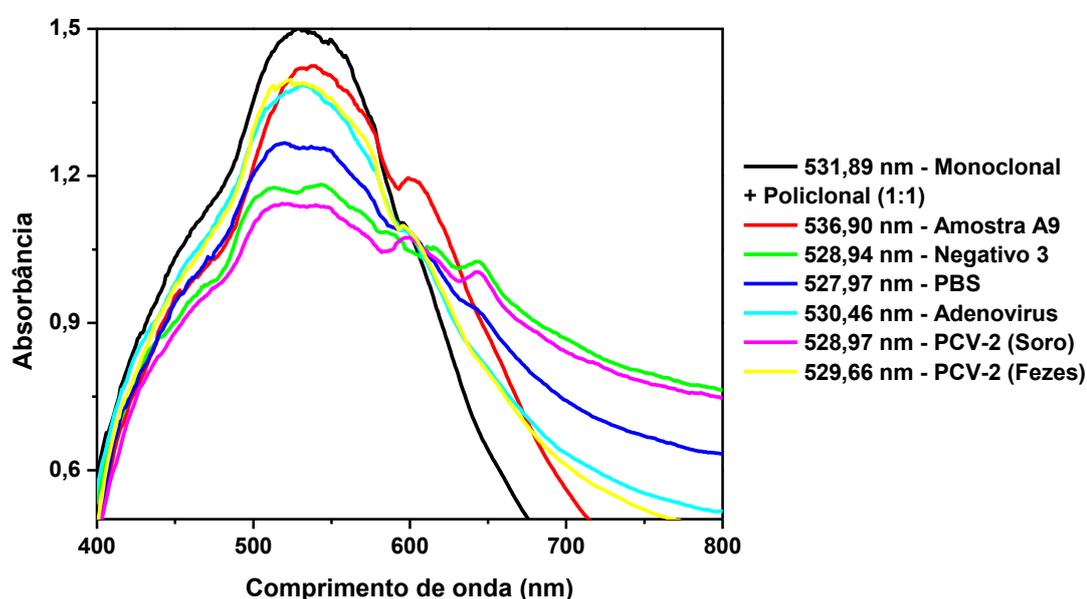
FIGURA 30 - Análise do limiar de detecção do protocolo. A - Gráfico do UV-Vis da amostra A12 diluída. B - Comparação dentre os valores de comprimento de onda e o Log_2 das respectivas diluições.



Para avaliar a especificidade do protocolo amostras de soro positivas para adenovírus e circovirus suíno 2 (CVS-2) e uma de fezes positiva para CVS-2, foram submetidas a técnica. Ambas famílias virais, *Adenoviridae* e *Circoviridae*, compreendem DNA vírus com a ausência de envelope viral, similar aos parvovirus (GAVA *et al.*, 2018; KULANAYAKE; TIKOO, 2021; MIETZSCH; PÉNZES; AGBANDJE-MCKENNA, 2019). Na figura 31 temos a análise por UV-Vis para avaliação de possível ligação

cruzada com outras amostras virais. A etapa com a combinação de ambos os anticorpos apresentou um comprimento de onda de 531,89 nm, que com a adição da amostra de soro de adenovírus e CVS-2 alterou-se -1,43 e -2,92 nm, respectivamente. A amostra de fezes de CVS-2 também apresentou uma redução do comprimento de onda de -2,23 nm, assim como com a adição de PBS (-3,92 nm). Não foi evidenciado ligação inespecífica do complexo de AuNPs com as amostras virais similares ao parvovirus, demonstrando uma seletividade ótima do imunossensor.

FIGURA 31 – Gráfico da análise do comprimento de onda da solução de AuNPs com complexo após adição de amostras interferentes.



Os resultados aqui apresentados também podem auxiliar na elaboração de técnicas futuras de *point of care testing*, uma vez que o uso das AuNPs já foi descrito em protocolos de diagnósticos rápidos colorimétricos (BASSO et al., 2015, 2019, 2022; GAO et al., 2015; LIU et al., 2018; VERDOODT et al., 2017). Em contrapartida, não foi constatada a alteração da coloração da solução após adição das amostras positivas, mesmo com a confirmação da ligação viral no complexo, resultados similares a um estudo prévio (BASSO et al., 2018). Contudo, os resultados aqui presentes são de muita valia para elaboração de futuros *point of care testing* com uso das AuNPs associadas a outras metodologias, como as de fluxo lateral (MARIN; NIKOLIC; VIDIC, 2021; SHARMA et al., 2018).

Por fim, o protocolo se demonstrou financeiramente mais vantajoso. Com todos os reagentes utilizados, o valor de custo por amostra ficou em torno de R\$5,00, mais

acessível em comparação aos métodos moleculares (\pm R\$70,00) e diagnósticos rápidos (\pm R\$50,00) disponíveis no mercado. Além de rápida, com tempo de execução de aproximadamente 40 minutos.

6. CONCLUSÃO

O uso das AuNPs como biossensores para detecção do PVC-2 por meio da análise de UV-visível se mostrou uma técnica rápida, confiável e barata em comparação ao teste ouro de qPCR. A combinação de anticorpos monoclonal e policlonal apresentou um melhor resultado, principalmente em relação ao uso isolado do policlonal. Foi possível detectar as três variantes pelo protocolo, sem relação cruzada com outras amostras virais similares ao parvovirus. Apesar da ausência de associação do valor de comprimento de onda com a concentração viral na amostra, para parvovirose canina, somente o diagnóstico qualitativo (positivo ou negativo) é o suficiente para dar continuidade ao tratamento e posterior controle de surtos da doença, sendo ainda um protocolo promissor.

7. REFERÊNCIAS

ALDEWACHI, H.; CHALATI, T.; WOODROOFE, M. N.; BRICKLEBANK, N.; SHARRACK, B.; GARDINER, P. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 18–33, 2018.

ALVES, C. D. B. T.; GRANADOS, O. F. O.; BUDASZEWSKI, R. da F.; STRECK, A. F.; WEBER, M. N.; CIBULSKI, S. P.; PINTO, L. D.; IKUTA, N.; CANAL, C. W. Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 1, p. 4–8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.006>>

BAGSHAW, C.; ISDELL, A. E.; THIRUVAIYARU, D. S.; BRISBIN, I. L.; SANCHEZ, S. Molecular detection of canine parvovirus in flies (Diptera) at open and closed canine facilities in the eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, [s. l.], v. 114, n. 3–4, p. 276–284, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.005>>

BASSO, C. R.; CRULHAS, B. P.; CASTRO, G. R.; PEDROSA, V. A. A Study of the

Effects of pH and Surfactant Addition on Gold Nanoparticle Aggregation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 5458–5468, 2020. a.

BASSO, C. R.; CRULHAS, B. P.; MAGRO, M.; VIANELLO, F.; PEDROSA, V. A. A new immunoassay of hybrid nanomater conjugated to aptamers for the detection of dengue virus. **Talanta**, [s. l.], v. 197, n. December 2018, p. 482–490, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.058>>

BASSO, C. R.; CRUZ, T. F.; SILVA, B. L.; PEDROSA, V. A.; ARAÚJO, J. P. A methodology for porcine circovirus 2 (PCV-2) quantification based on gold nanoparticles. **Materials**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1–13, 2020. b.

BASSO, C. R.; DE CAMARGO TOZATO, C.; MENDES RIBEIRO, M. C.; ARAUJO JUNIOR, J. P.; PEDROSA, V. A. A immunosensor for the diagnosis of canine distemper virus infection using SPR and EIS. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 19, p. 5089–5095, 2013.

BASSO, C. R.; TOZATO, C. C.; CRULHAS, B. P.; CASTRO, G. R.; JUNIOR, J. P. A.; PEDROSA, V. A. An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates. **Virology**, [s. l.], v. 513, n. October 2017, p. 85–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.001>>

BASSO, C. R.; TOZATO, C. C.; JUNIOR, J. P. A.; PEDROSA, V. A. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2264–2267, 2015. a.

BASSO, C. R.; TOZATO, C. C.; JUNIOR, J. P. A.; PEDROSA, V. A. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. **Analytical Methods A**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2264–2267, 2015. b.

BASSO, C. R.; YAMAKAWA, A. C.; PEDROSA, V. A.; MAGRO, M.; VIANELLO, F. Colorimetric Kit for Rapid Porcine Circovirus 2 (PCV-2) Diagnosis. **Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 570, 2022.

BEHDENNA, A.; LEMBO, T.; CALATAYUD, O.; CLEAVELAND, S.; HALLIDAY, J. E. B.; PACKER, C.; LANKESTER, F.; HAMPSON, K.; CRAFT, M. E.; CZUPRYNA, A.; DOBSON, A. P.; DUBOVI, E. J.; ERNEST, E.; FYUMAGWA, R.; HOPCRAFT, J. G. C.; MENTZEL, C.; MZIMBIRI, I.; SUTTON, D.; WILLETT, B.; HAYDON, D. T.; VIANA, M. Transmission ecology of canine parvovirus in a multi-host , multi-pathogen

system. **Proc. R. Soc. B**, [s. l.], v. 286, p. 1–10, 2019.

BIANCHETTI, A. **Signal processing techniques for the development of immunosensors**. 2018. [s. l.], 2018.

BINN, L. N.; LAZAR, E. C.; EDDY, G. A.; KAJIMA, M. Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines 1. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 503–508, 1970.

BRADY, S.; NORRIS, J. M.; KELMAN, M.; WARD, M. P. Canine parvovirus in Australia: The role of socio-economic factors in disease clusters. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 522–528, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.025>>

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLA, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 82, n. 12, p. 3021–3025, 2001.

BURTONBOY, G.; COIGNOUL, F.; DELFERRIERE, N.; PASTORET, P. P. Canine hemorrhagic enteritis: Detection of viral particles by electron microscopy. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 61, n. 1–2, p. 1–11, 1979.

CARMICHAEL, L. E.; BINN, L. N. New enteric viruses in the dog. **Adv Vet Sci Comp Med**, [s. l.], v. 25, p. 1–37, 1981.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C.; POLLOCK, R. V. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 784–791, 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6250432/>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

CARMICHAEL, L. E.; SCHLAFER, D. H.; HASHIMOTO, A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 165–174, 1994.

CASTRO, T. X.; MIRANDA, S. C.; LABARTHE, N. V.; SILVA, L. E.; GARCIA, R. C. N. C. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995 – 2004. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 333–339, 2007.

CAVALLI, A.; MARINARO, M.; DESARIO, C.; CORRENTE, M.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. In vitro virucidal activity of sodium hypochlorite against canine parvovirus type 2. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 146, n. 15, p. 2010–2013, 2018.

CORBAU, R.; DUVERGER, V.; ROMMELAERE, J.; NÜESCH, J. P. F. Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: Impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. **Virology**, [s. l.], v. 278, n. 1, p. 151–167, 2000.

COTMORE, S. F.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; CANUTI, M.; CHIORINI, J. A.; EIS-HUBINGER, A. M.; HUGHES, J.; MIETZSCH, M.; MODHA, S.; OGLIASTRO, M.; PÉNZES, J. J.; PINTEL, D. J.; QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; TATTERSALL, P.; TIJSSEN, P.; LEFKOWITZ, E. J.; DAVISON, A. J.; SIDDELL, S. G.; SIMMONDS, P.; SABANADZOVIC, S.; SMITH, D. B.; ORTON, R. J.; HARRACH, B. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 367–368, 2019.

CRANDELL, R. A.; FABRICANT, C. G.; NELSON-REES, W. A. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). **In Vitro**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 176–185, 1973.

CURI, N. H. de A.; MASSARA, R. L.; PASCHOAL, A. M. de O.; SORIANO-ARAÚJO, A.; LOBATO, Z. I. P.; DEMÉTRIO, G. R.; CHIARELLO, A. G.; PASSAMANI, M. Prevalence and risk factors for viral exposure in rural dogs around protected areas of the Atlantic forest. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 12, n. 21, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0646-3>>

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.

DAY, M. J.; HORZINEK, M. C.; SCHULTZ, R. D. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, [s. l.], v. 51, n. June, p. 338–356, 2010.

DE OLIVEIRA SANTANA, W.; SILVEIRA, V. P.; WOLF, J. M.; KIPPER, D.; ECHEVERRIGARAY, S.; CANAL, C. W.; TRUYEN, U.; LUNGE, V. R.; STRECK, A. F. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis

of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 98, 2022.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>>

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus post-vaccination shedding: Interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 221, n. January, p. 23–24, 2017.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. **Biologicals**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 261–267, 2005. a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D. D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M. J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; BUONAVOGLIA, C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1222–1224, 2007. a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; BILLI, M.; LORUSSO, E.; COLAIANNI, M. L.; COLAO, V.; ELIA, G.; VENTRELLA, G.; KUSI, I.; BO, S.; BUONAVOGLIA, C. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 504–507, 2013.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; MARI, V.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1161–1166, 2007. b.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; TRANI, L. Di; TARSITANO, E.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 19–28, 2005. b.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A. L.; CAMERO, M.; MANNA, L.; D'ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. **Journal of Veterinary Medicine**

Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 468–472, 2006.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Soroprevalência das infecções por parvovírus , adenovírus , coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria , Rio Grande do Sul , Brasil. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 183–189, 2007.

EMMANUEL, S. N.; MIETZSCH, M.; TSENG, Y. S.; SMITH, J. K.; AGBANDJE-MCKENNA, M. Parvovirus Capsid-Antibody Complex Structures Reveal Conservation of Antigenic Epitopes across the Family. **Viral Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 3–17, 2021.

ESTHER YIP, H. Y.; PEASTON, A.; WOOLFORD, L.; KHUU, S. J.; WALLACE, G.; KUMAR, R. S.; PATEL, K.; AZARI, A. A.; AKBARZADEH, M.; SHARIFIAN, M.; AMANOLLAHI, R.; JOZANI, R. J.; KHABIRI, A.; HEMMATZADEH, F. Diagnostic challenges in Canine Parvovirus 2c in vaccine failure cases. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–13, 2020.

FONTANA, D. S.; ROCHA, P. R. D.; CRUZ, R. A. S.; LOPES, L. L.; MELO, A. L. T.; SILVEIRA, M. M.; AGUIAR, D. M.; PESCADOR, C. A.; S, A. F. D.; ROCHA, P. R. D.; CRUZ, R. A. S.; LOPES, L. L.; MELO, A. L. T.; SILVEIRA, M. M.; AGUIAR, D. M.; PESCADOR, C. A. A.; VETERINÁRIA, M.; AGRONOMIA, F. De; VETERINÁRIA, M. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 214–218, 2013.

FRATODDI, I. Hydrophobic and hydrophilic au and ag nanoparticles. Breakthroughs and perspectives. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.

GAO, L.; LIU, M.; MA, G.; WANG, Y.; ZHAO, L.; YUAN, Q.; GAO, F.; LIU, R.; ZHAI, J.; CHAI, Z.; ZHAO, Y.; GAO, X. Peptide-Conjugated Gold Nanoprobe: Intrinsic Nanozyme-Linked Immunosorbant Assay of Integrin Expression Level on Cell Membrane. **ACS Nano**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 10979–10990, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.5b04261>>. Acesso em: 25 maio. 2022.

GAVA, D.; SERRÃO, V. H. B.; FERNANDES, L. T.; CANTÃO, M. E.; CIACCIZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SCHAEFER, R. Structure analysis of capsid protein of Porcine circovirus type 2 from pigs with systemic disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 351–357, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.007>>

GHOSH, S.; DASGUPTA, S. C.; DASGUPTA, A. K.; GOMES, A.; GOMES, A. Gold Nanoparticles (AuNPs) Conjugated with Andrographolide Ameliorated Viper (*Daboia russellii russellii*) Venom-Induced Toxicities in Animal Model. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 3404–3414, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31748033/>>. Acesso em: 31 maio. 2022.

GIZZI, A. B. da R.; OLIVEIRA, S. T.; LEUTENEGGER, C. M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D. A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **BMC veterinary research**, [s. l.], v. 10, n. 23, p. 1–8, 2014.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1041–1053, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>>

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L.; CHRISTOPHER, M. M.; DUNCAN, N. M.; BECKER, P. J. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 309–316, 2008.

GOGONE, I. C. V. P.; DE BARROS, F. R. O.; POSSATTI, F.; ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E. Detection of canine parvovirus types 2b and 2c in canine faecal samples contaminating urban thoroughfares in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 138–143, 2020.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE¹, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, [s. l.], v. 8, n. January, p. 1400–1458, 2008.

HAFENSTEIN, S.; BOWMAN, V. D.; SUN, T.; NELSON, C. D. S.; PALERMO, L. M.; CHIPMAN, P. R.; BATTISTI, A. J.; PARRISH, C. R.; ROSSMANN, M. G. Structural Comparison of Different Antibodies Interacting with Parvovirus Capsids. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 83, n. 11, p. 5556–5566, 2009.

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, [s. l.], v. 16, n. 7–8, p. 262–271, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>>

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M. C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J. T. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 535–539, 2007.

HONG, R.; FISCHER, N. O.; EMRICK, T.; ROTELLO, V. M. Surface PEGylation and ligand exchange chemistry of FePt nanoparticles for biological applications. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 17, n. 18, p. 4617–4621, 2005. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm0507819>>. Acesso em: 26 maio. 2022.

HUEFFER, K.; PARKER, J. S. L.; WEICHERT, W. S.; GEISEL, R. E.; SGRO, J.-Y.; PARRISH, C. R. The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 1718–1726, 2003.

HUEFFER, K.; PARRISH, C. R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 392–398, 2003.

ICTV, I. C. on T. of V. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. 2021. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

JOHNSON, R. H.; SMITH, J. R. Epidemiology and pathogenesis of canine parvovirus. **Aust Vet Pract**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 31, 1983.

KAUR, G.; CHANDRA, M.; DWIVEDI, P. N.; SHARMA, N. S. Isolation of canine parvovirus with a view to identify the prevalent serotype on the basis of partial sequence analysis. **Veterinary World**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 52–56, 2015.

KELLY, W. R. An enteric disease of dogs resembling feline Panleucopaenia. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 54, p. 593, 1978.

KELMAN, M.; WARD, M. P.; BARRS, V. R.; NORRIS, J. M. The geographic distribution and financial impact of canine parvovirus in Australia. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 299–311, 2019.

KHATRI, R.; POONAM; MOHAN, H.; MINAKSHI; CS, P. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Canine Parvovirus Disease in Dogs: A Mini Review. **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, [s. l.], v. 06, n. 03, 2017.

KILIAN, E.; SUCHODOLSKI, J. S.; HARTMANN, K.; MUELLER, R. S.; WESS, G.;

UNTERER, S. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–11, 2018.

KIM, H. S.; KIM, Y. J.; CHON, J. W.; KIM, D. H.; YIM, J. H.; KIM, H.; SEO, K. H. Two-stage label-free aptasensing platform for rapid detection of Cronobacter sakazakii in powdered infant formula. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 239, p. 94–99, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.173>>

KULANAYAKE, S.; TIKOO, S. K. Adenovirus core proteins: Structure and function. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–16, 2021.

KUMAR, S.; YOON, S. H.; KIM, G. H. Bridging the nanogap electrodes with gold nanoparticles using dielectrophoresis technique. **Current Applied Physics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 101–103, 2009.

LAMM, C. G.; REZABEK, G. B. Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 837–850, 2008.

LARSON, L. J.; SCHULTZ, R. D. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? **Vet Ther**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 94–101, 2008.

LATHAM, A. H.; WILLIAMS, M. E. Versatile routes toward functional, water-soluble nanoparticles via trifluoroethylene-PEG-thiol ligands. **Langmuir**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4319–4326, 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la053523z>>. Acesso em: 26 maio. 2022.

LEDLOD, S.; AREEKIT, S.; SANTIWATANAKUL, S.; CHANSIRI, K. Colorimetric aptasensor for detecting Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli in meat samples. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 430–443, 2020.

LIN, D.; WU, J.; JU, H.; YAN, F. Signal amplification for electrochemical immunosensing by in situ assembly of host-guest linked gold nanorod superstructure on immunocomplex. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 195–200, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.070>>

LIU, G.; LU, M.; HUANG, X.; LI, T.; XU, D. Application of gold-nanoparticle

colorimetric sensing to rapid food safety screening. **Sensors (Switzerland)**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1–16, 2018.

LÖFLING, J.; LYI, S. M.; PARRISH, C. R.; VARKI, A. Canine and Feline Parvoviruses Preferentially Recognize the Non-Human Cell Surface Sialic Acid N-glycolylneuraminic acid. **2Virology**, [s. l.], v. 440, n. 1, p. 89–96, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A. **Sensors and actuators B: Chemical**. 91. ed. [s.l.: s.n.].

MARIN, M.; NIKOLIC, M. V.; VIDIC, J. Rapid point-of-need detection of bacteria and their toxins in food using gold nanoparticles. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, [s. l.], p. 1–21, 2021.

MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Evolution of CPV-2 and impliceance for antigenic/genetic characterization. **Virus Genes**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 11–13, 2006.

MAZZAFERRO, E. M. Update on Canine Parvoviral Enteritis. **Vet Clin Small Anim**, [s. l.], v. 50, n. January, p. 1307–1325, 2020.

MCGAVIN, D. Inactivation of canine parvovirus by disinfectants and heat. **J Small Anim Pract**, [s. l.], v. 28, p. 523–535, 1987.

MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 585–594, 2005.

MIETZSCH, M.; PÉNZES, J. J.; AGBANDJE-MCKENNA, M. Twenty-five years of structural parvovirology. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2019.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, n. 9, p. 2043–2057, 2016.

MORTEZAEI, M.; DADMEHR, M.; KOROUZHDEHI, B.; HAKIMI, M.; RAMSHINI, H. Colorimetric and label free detection of gelatinase positive bacteria and gelatinase activity based on aggregation and dissolution of gold nanoparticles. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 191, n. August, p. 106349, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106349>>

MRADULA; RAJ, R.; DEVI, S.; MISHRA, S. Antibody-labeled gold nanoparticles based immunosensor for the detection of thyroxine hormone. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 799–806, 2020.

NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; PHUNG, H. T. T.; NGUYEN, N. H.; HUYNH, L. M. T.; NGUYEN, L. T.; NGUYEN, P. N.; NGUYEN, P. V.; NGUYEN, N. P. T.; AKASHI, H. A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 149, n. 11, p. 2261–2269, 2004.

NANDI, S.; KUMAR, M. Canine parvovirus: Current perspective. **Indian Journal of Virology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 31–44, 2010.

NEGAHDARI, B.; DARVISHI, M.; SAEEDI, A. A. Gold nanoparticles and hepatitis B virus. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 469–474, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1546185>>

NÜESCH, J. P. F.; ROMMELAERE, J. NS1 Interaction with CKII α : Novel Protein Complex Mediating Parvovirus-Induced Cytotoxicity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 10, p. 4729–4739, 2006.

OBERACKER, P.; STEPPER, P.; BOND, D. M.; HÖHN, S.; FOCKEN, J.; MEYER, V.; SCHELLE, L.; SUGRUE, V. J.; JEUNEN, G. J.; MOSER, T.; HORE, S. R.; MEYENN VON, F.; HIPPEL, K.; HORE, T. A.; JURKOWSKI, T. P. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–16, 2019.

OMIDFAR, K.; KIA, S.; KASHANIAN, S.; PAKNEJAD, M.; BESHARATIE, A.; KASHANIAN, S.; LARIJANI, B. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 843–855, 2010.

OU, J.; ZHOU, Z.; CHEN, Z.; TAN, H. Optical diagnostic based on functionalized gold nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, 2019.

PAES, A. C. Parvovirose Canina. In: **Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 768–785.

PARKER, J. S. L.; PARRISH, C. R. Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower

- Intracellular Trafficking. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 1919–1930, 2000.
- PARRISH, C. R.; AQUADRO, C. F.; STRASSHEIM, M. L.; EVERMANN, J. F.; SGRO, J. Y.; MOHAMMED, H. O. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 6544–6552, 1991.
- PARRISH, C. R.; CARMICHAEL, L. E. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. **Virology**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 401–414, 1983.
- PARRISH, C. R.; HAVE, P.; FOREYT, W. J.; EVERMANN, J. F.; SENDA, M.; CARMICHAEL, L. E. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 1111–1116, 1988.
- PARRISH, C. R.; O'CONNELL, P. H.; EVERMANN, J. F.; CARMICHAEL, L. E. Natural variation of canine parvovirus. **Science**, [s. l.], v. 230, n. 4729, p. 1046–1048, 1985.
- PARTHIBAN, S.; MUKHOPADHYAY, H. K.; PANNEER, D.; ANTONY, P. X.; PILLAI, R. M. Isolation and Typing of Canine Parvovirus in CRFK Cell Line in Puducherry, South India. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 456–460, 2011.
- PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 124, n. 1–2, p. 147–152, 2007.
- PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; SOUZA, K. R. G. C. K.; CORBELLINI, Â. O. C. L. G.; CANAL, C. W. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, [s. l.], v. 165, n. Dubina, Luciane, p. 29–33, 2012.
- RAMBUKWELLA, M.; SAKTHIVEL, N. A.; DELCAMP, J. H.; SEMENTA, L.; FORTUNELLI, A.; DASS, A. Ligand structure determines nanoparticles' atomic structure, metal-ligand interface and properties. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. AUG, 2018.
- RETH, M. Matching cellular dimensions with molecular sizes. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 765–767, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.2621>>

RODRÍGUEZ-LORENZO, L.; DE LA RICA, R.; ÁLVAREZ-PUEBLA, R. A.; LIZMARZÁN, L. M.; STEVENS, M. M. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. **Nature Materials** 2012 **11**:7, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 604–607, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmat3337>>. Acesso em: 25 maio. 2022.

SCHMITZ, S.; COENEN, C.; KONIG, M.; THIEL, H.-J.; NEIGER, R. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. **J Vet Diagn Invest**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 344–345, 2009.

SELVAKUMAR, L. S.; RAGAVAN, K. V.; ABHIJITH, K. S.; THAKUR, M. S. Immunodipstick based gold nanosensor for vitamin B12 in fruit and energy drinks. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1806–1810, 2013.

SEOW, N.; LAI, P. S.; YUNG, L. Y. L. Gold nanostructures for the multiplex detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene mutations. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 451, n. 1, p. 56–62, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.01.014>>

SHARMA, C.; SINGH, M.; UPMANYU, V.; CHANDER, V.; VERMA, S.; CHAKROVARTY, S.; SHARMA, G. K.; DHANZE, H.; SINGH, P.; SHRIVASTAVA, S.; KUMAR, J.; GOSWAMI, T. K.; GUPTA, V. K. Development and evaluation of a gold nanoparticle-based immunochromatographic strip test for the detection of canine parvovirus. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 163, n. 9, p. 2359–2368, 2018.

SIME, T. A.; POWELL, L. L.; SCHILDT, J. C.; OLSON, E. J. Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. **Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 765–769, 2015.

SMITH, E. A.; CORN, R. M. Surface Plasmon Resonance imaging as a tool to monitor biomolecular interactions in an array based format. **Applied Spectroscopy**, [s. l.], v. 57, p. 320A-332A, 2003.

STRECK, A. F.; SOUZA, C. K. De; GONÇALVES, K. R.; ZANG, L.; PINTO, L. D.; CANAL, C. W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 465–469, 2009.

SUN, X.; GUO, S.; CHUNG, C. S.; ZHU, W.; SUN, S. A sensitive H₂O₂ assay based on

dumbbell-like PtPd-Fe₃O₄ nanoparticles. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 132–136, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23060096/>>. Acesso em: 25 maio. 2022.

TAVORA, F.; GONZALEZ-CUYAR, L. F.; DALAL, J. S.; O'MALLEY, M. T.; ZHAO, R.; PENG, H. Q.; BURKE, A. P. Fatal parvoviral myocarditis: A case report and review of literature. **Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–6, 2008.

TELLO, L.; PEREZ-FREYTES, R. Fluid and Electrolyte Therapy During Vomiting and Diarrhea. **Vet Clin Small Anim**, [s. l.], v. 47, n. January, p. 505–519, 2017.

TRUYEN, U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 1–2, p. 47–50, 1999.

TSAO, J.; CHAPMAN, M. S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.; SMITH, T. J.; ROSSMANN, M. G.; COMPANS, R. W.; PARRISH, C. R. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, [s. l.], v. 251, n. 5000, p. 1456–1464, 1991.

VERDOODT, N.; BASSO, C. R.; ROSSI, B. F.; PEDROSA, V. A. Development of a rapid and sensitive immunosensor for the detection of bacteria. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 221, p. 1792–1796, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.102>>

VIEIRA, M. J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A. L.; DECARO, N.; DESARIO, C.; MULLER, A.; CARVALHEIRA, J.; BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 488–491, 2008.

VIEIRA, F. V.; HOFFMANN, D. J.; FABRI, C. U. F.; BRESCIANI, K. D. S.; GAMEIRO, R.; FLORES, E. F.; CARDOSO, T. C. Circulation of canine parvovirus among dogs living in human-wildlife interface in the Atlantic forest biome, Brazil. **Heliyon**, [s. l.], n. June, p. e00491, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00491>>

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUSHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques** 10(4): 506-13 (April 1991). **BioTechniques**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 134–139, 2013.

XI, Z.; YE, H.; XIA, X. Engineered Noble-Metal Nanostructures for in Vitro Diagnostics. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 30, n. 23, p. 8391–8414, 2018.

ZHOU, P.; ZENG, W.; ZHANG, X.; LI, S. The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–13, 2017.

ZHU, H.; SIGDEL, A.; ZHANG, S.; SU, D.; XI, Z.; LI, Q.; SUN, S. Core/Shell Au/MnO Nanoparticles Prepared Through Controlled Oxidation of AuMn as an Electrocatalyst for Sensitive H₂O₂ Detection. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 53, n. 46, p. 12508–12512, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201406281>>. Acesso em: 25 maio. 2022.