



Simpósio de Integração Acadêmica

“Bicentenário da Independência: 200 anos de ciência, tecnologia e inovação no Brasil e 96 anos de contribuição da UFV”

SIA UFV 2022



Diversidade genética e avaliação de epítomos putativos de *Porcine circovirus 3*

Departamento de Veterinária - Medicina Veterinária - UFV

Jordano Alexandre de Carvalho¹ (jordano.carvalho@ufv.br), Abelardo Silva Júnior² (abelardo.junior@ufv.br), Ana Alice Pimenta Pereira³, Larissa Lana de Paula Leber⁴, Viviane Sisdelli Assao⁵, Júnio César Santos⁶

¹Graduando em Medicina Veterinária - DVT/UFV, ²Docente do Departamento de Veterinária - UFV, ³Graduanda em Medicina Veterinária - DVT/UFV, ⁴Doutoranda em Medicina Veterinária - DVT/UFV, ⁵Doutora em Medicina Veterinária - DVT/UFV, ⁶Mestrando em Medicina Veterinária - DVT/UFV

Palavras-chave: *Porcine circovirus 3*, Nested PCR, Biologia Molecular

Grande Área: Ciências Agrárias

Área Temática: Medicina Veterinária

Categoria do Trabalho: Pesquisa

Introdução

Os *Porcine circovirus* (PCV) são uma espécie de vírus não-envelopados e seu material genético é composto por de DNA fita simples circular. Atualmente são conhecidas e descritas 4 espécies: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4, e o PCV3, descrito pela primeira vez em 2016, tem sido associado com diversas condições como falha reprodutiva, síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) e outras doenças associadas aos *Porcine circovirus* (PCVAD).

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi realizar a padronização de um ensaio de Nested-PCR para detecção e amplificação do DNA viral para sequenciamento de amostras de PCV3 de suínos naturalmente infectados e análises de bioinformática.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de leitões desmamados previamente testadas por qPCR pelo grupo de pesquisa, coletadas no estado do Paraná em 2018 e 2019. Os primers foram desenhados visando amplificar a região da ORF2, que codifica o gene para a proteína do capsídeo do PCV3, a VP2, principal proteína antigênica do vírus. Foram desenhados 2 primers senso (forward) e 1 primer antissenso (reverse), e para a segunda reação foram desenhados 2 primers forward e 1 primer reverse. Como controle positivo para a padronização, foi realizada a extração de DNA de uma amostra sabidamente positiva, utilizando o kit Wizard SV Genomic DNA Purification System®. Foi realizado um gradiente de temperaturas em termociclador, com o seguinte ciclo: desnaturação a 94°C/5min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C/30s, anelamento a 53-62°C/30s, extensão a 72°C/45s; e extensão a 72°C/7min. Em seguida, as amostras correram num gel de Agarose a 1% em tampão Tris-Boro-EDTA (TBE) 0,5x.

Nome	Alvo	Sequência	Tm	%GC	Reação
F1E	ORF2	GGCCTGTTTAGGAGGTTTAC	58,84°C	52,38%	1ª
F2E		TGTTTAGGAGGTTTACTAAGG	54,58°C	42,86%	
RE		CTCCGGACCTAGAATAGGATG	56,49°C	52,38%	
F1I		TGACATGGAGACAGTGTATCC	56,83°C	47,62%	2ª
F2I		GTGTACAATTATTGCGTTGGG	55,86°C	42,86%	
RI	TATATCCACTCACACGGTGC	55,86°C	42,86%		
Endógeno	18s	GCCTCGAAAGAGTCTGTATTG	58,81°C	50,00%	PCR
Forward	rRNA				
Endógeno	18s	CTGAGAAACGGCTACCCATC	58,73°C	52,38%	PCR
Reverse	rRNA				

Tabela 1 - Sequência dos primers desenhados para detecção de PCV3 (Nested PCR) e controle endógeno (PCR)

Resultados e Discussão

A temperatura de anelamento ótima encontrada foi de 59°C. Entretanto, não houve marcação de bandas no gel ao utilizar a técnica com as amostras do Paraná, que já haviam sido submetidas a um ensaio de PCR em tempo real (qPCR). Houve incoerência entre os resultados de Nested PCR e qPCR, de forma que não foi obtida a sensibilidade maior esperada do ensaio de Nested PCR

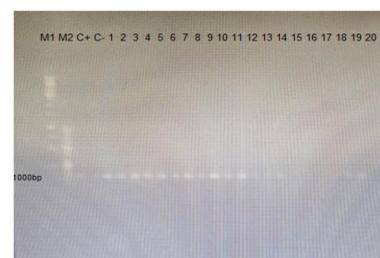


Fig 1 – Padronização do ensaio de Nested PCR bem sucedido com amostras de PCV3 positivas

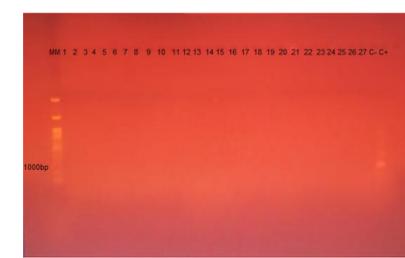


Fig 2 – Nested PCR com amostras de soro de suínos do estado do Paraná. Marcação no último poço é o controle positivo

Conclusões

Pode-se hipotetizar que o ensaio estudado não se mostra viável para carga viral muito baixa e não foi possível obter a amplificação. Para continuidade do trabalho, novas amostras devem ser coletadas considerando a doença clínica severa dos animais para amplificação por Nested-PCR. A partir destas amostras será possível encontrar animais com a carga viral mais alta e amplificar por PCR convencional e obter DNA adequado para o sequenciamento

Bibliografia

Retrospective study of porcine circovirus 3 (PCV3) in swine tissue from Brazil (1967–2018) I. L. F. Rodrigues & A. C. M. Cruz¹ & A. E. Souza¹ & F. B. Knackfuss & C. H. C. Costa & R. L. Silveira¹, & T. X. Castro <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00281-6>
Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., ... Hause, B. M. (2016). A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *Journal of Virology*, 91(1). doi:10.1128/jvi.01879-16

Apoio Financeiro



Agradecimentos

