

MARIANA COSTA FAUSTO

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) PARA SOROLOGIA,
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

MARIANA COSTA FAUSTO

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) PARA SOROLOGIA,
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 07 de maio de 2010.

Prof. Leandro Licursi de Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Abelardo Silva Júnior
(Co-orientador)

Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato

Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

Aos meus pais, aos meus irmãos, aos meus avôs. Essenciais!

Mais Um a Vez

Mas é claro que o sol

Vai voltar amanhã

Mais um a vez, eu sei

Escuridão já vi pior

Doidecer gente sã

Espera que o sol já vem

Tem gente que está do mesmo lado que você

Mas deveria estar do lado de lá

Tem gente que machuca os outros

Tem gente que não sabe amar

Tem gente enganando a gente

Veja nossa vida com o está

Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança

Flávio Venturini e Renato Russo

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, paciência, força e coragem para encarar todos os obstáculos.

A minha família pela amizade de todas as horas. Ao meu pai Rubens, pelos conselhos diários via internet. A minha mãe Valéria, pela convivência e companheirismo. Aos meus irmãos, Cecília e Guilherme pelo amor incondicional. Aos meus sobrinhos Luca e Carol pelos momentos de alegria. Aos meus tios e tias por todo apoio e carinho. Ao meu tio Bill pelo exemplo de competência na nossa profissão. Aos meus avôs Manoel, Maria Alice e Teco pelo incentivo e aconchego. A minha vovó Carmem, *in memoriam*, pelas risadas gostosas, quanta saudade! Amo muito vocês.

A Professora Márcia Rogéria por confiar em mim e no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade oferecida, fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela paciência, tolerância, amizade, pelo exemplo de luta e perseverança, além da valiosa orientação, realização e revisão deste trabalho.

Ao Professor Abelardo pela preocupação, amizade e apoio durante todo o trabalho.

Ao Professor Leandro pela disposição em ajudar nos experimentos e não me deixar desanimar perante as diversas dificuldades encontradas.

A Professora Juliana Fietto pelo exemplo de seriedade e serenidade.

Ao Professor Joaquim Patarroyo pelas orientações informais no corredor do BIOAGRO e por me disponibilizar o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores.

A Professora Zélia Lobato pelas amostras cedidas para a realização desse trabalho.

Ao técnico Marcinho, pela importantíssima ajuda na parte final e essencial do trabalho. Muito obrigada.

Ao Sr. Valdir pela companhia e pelas conversas engraçadas que me ajudavam a espantar o sono bem cedinho no laboratório.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária pelos ensinamentos passados durante a graduação e o mestrado.

Aos meus amigos do LIMA, pela boa convivência e risadas.

A Luana e o Rodrigo por estarem sempre prontos a me ajudar.

A Ethel, pelas palavras de apoio e carinho que para mim, fizeram toda a diferença.

Ao Pedro, fundamental para o funcionamento do LIMA.

Ao Tchá Tchá pelo essencial auxílio nas purificações durante árduos finais de semana.

A Fê pela valiosa ajuda na reta final e pela revisão do trabalho.

A Lu e a Josy, pelo total apoio do início ao fim, pela competência e lealdade, amizade e companheirismo, incentivo e força, dentro e fora do trabalho. Serei sempre grata a vocês amigas. Muito obrigada!

A minha querida amiga irmã Thelma pela amizade eterna.

A Cunha querida, aos amigos da veterinária, a família CDO-Viçosa/BH, Juscilene, Bruninha, Ju Coura, Lidi, Taise, Ana Paula, e tantos outros, pela amizade e companheirismo nos momentos de descontração e diversão.

A CNPq pela bolsa concedida. À FAPEMIG e o CNPq/MAPA pelo apoio financeiro viabilizando o projeto.

Ao Departamento de Veterinária e ao BIOAGRO pelas condições de trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de carregar o nome da escola pelo resto da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Circovirose suína.....	3
2.1.1. <i>O Circovírus suíno e seus aspectos moleculares</i>	3
2.1.2. <i>Epidemiologia</i>	6
2.1.3. <i>Replicação viral</i>	7
2.1.4. <i>Características estruturais e funcionais da Cap PCV-2</i>	8
2.1.5. <i>Construções recombinante utilizando a Cap PCV-2</i>	9
2.1.6. <i>Patogênese e Síndromes Clínicas</i>	10
2.1.7. <i>Diagnóstico</i>	13
2.1.8. <i>Controle e prevenção</i>	13
2.2. Testes sorológicos.....	14
2.2.1. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	15
2.2.2. <i>Utilização do ELISA na validação de vacinas comerciais</i>	17
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Preparação e purificação da rCap PCV-2.....	20
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	20
4.3. ELISA indireto para diagnóstico sorológico.....	21
4.3.1. <i>Padronização do teste</i>	22
4.3.2. <i>Amostras de soro</i>	22
4.3.3. <i>Ensaio sorológico</i>	23

4.4. Produção de um soro policlonal anti-rCap PCV-2.....	23
4.5. Precipitação de IgG pelo método do ácido caprílico.....	24
4.6. Conjugação da IgGs precipitadas com peroxidase.....	25
4.7. Avaliação da especificidade das IgGs precipitadas anti-rCap PCV-2.....	25
4.8. ELISA de captura para quantificação da rCap PCV-2.....	26
4.8.1. Padronização do teste.....	27
4.9. Titulação dos anticorpos de captura e de detecção.....	28
4.10. Produção da curva padrão.....	28
4.11. Preparo dos extratos de <i>E.coli</i>	29
4.12. Quantificação da rCap PCV-2 no extrato vacinal de <i>E.coli</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Expressão e purificação da rCap PCV-2.....	30
5.2. ELISA indireto.....	31
5.2.1. Padronização do ELISA indireto.....	31
5.2.2. Avaliação do ELISA indireto qualitativo.....	34
5.2.3. Avaliação do ELISA indireto quantitativo.....	38
5.3. Precipitação e confirmação das IgG anti-rCap PCV-2.....	40
5.4. Avaliação da especificidade das IgGs precipitadas anti-rCap PCV-2.....	41
5.5. Titulação dos anticorpos de captura e de detecção.....	42
5.6. ELISA de captura.....	43
5.6.1. Padronização do teste.....	43
5.6.2. Produção da curva padrão.....	46
5.7. Quantificação da rCap PCV-2 no extrato vacinal.....	47
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
APÊNDICE 1: RESULTADO DO ELISA QUALITATIVO.....	61
APÊNDICE 2: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO DVT/UFV.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Genoma do PCV-2 esquematizado identificando as 6 ORFs.....	4
Figura 2: rCap PCV-2 purificada.....	30
Figura 3: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do soro policlonal e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA indireto: otimização da rCap PCV-2.....	32
Figura 4: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do soro policlonal e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA indireto: otimização da diluição do soro.....	32
Figura 5: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo secundário: otimização do anticorpo secundário anti-IgG suíno conjugado com peroxidase.....	33
Figura 6: Média dos valores de absorvância das amostras positivas e negativas para o ELISA	34
Figura 7: Amostras avaliadas pelo ELISA indireto qualitativo.....	35
Figura 8: ELISA quantitativo.....	39
Figura 9: Confirmação da precipitação das IgGs do soro de coelho policlonal anti-rCap PCV-2:.....	41
Figura 10: <i>Western blotting</i> do extrato de <i>E.coli</i> para verificação de rCap PCV-2....	42
Figura 11: Titulação do soro total de coelho anti-rCap PCV-2, dos anticorpos de captura e de detecção.....	43
Figura 12: Titulação <i>Checkerboard</i> para o ELISA de captura.....	44
Figura 13: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização da rCap PCV-2.....	44
Figura 14: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização do anticorpo de detecção.....	45
Figura 15: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização do anticorpo de captura.....	45
Figura 16: Curva padrão da rCap PCV-2 para estimativa da concentração protéica.	47
Figura 17: Determinação da concentração protéica de rCap PCV-2 presente em extrato de <i>E.coli</i>	48
Figura 18: Determinação da concentração protéica de rCap PCV-2 presente em extrato de <i>E.coli</i> , através do gráfico.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação do limiar de positividade: valor de <i>cut off</i> de soros negativos para o ELISA.....	35
Tabela 2: Validação ^a do ELISA para diagnóstico sorológico de PCV-2.....	36
Tabela 3: Resultado da validação do ELISA para ensaio sorológico de PCV-2.....	36
Tabela 4: Título e Limiar de detecção ELISA/IPMA de 20 amostras de soro.....	39
Tabela 5: Quantificação da rCap PCV-2 nas diferentes diluições do extrato de <i>E.coli</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- AASV: *American Association of Swine Veterinarians*
- BSA: Albumina do soro bovino
- Cap: Proteína do capsídeo do PCV-2
- CD25: Receptor de interleucina 2
- *Cut off*: Ponto de corte
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- DO: Densidade óptica
- EIA: *Enzyme immunoassay*
- ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*
- g: Unidade de força centrífuga relativa
- IFA: Imunofluorescência indireta
- Ig: Imunoglobulina
- IHC: Imuno Histoquímica
- IHS: Hibridização *in situ*
- IL: Interleucina
- INF- γ : Interferon gama
- IPMA: Imunoperoxidase em monocamada
- IPTG: *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
- LB: Meio de cultura *Luria-Bertani broth*
- MHC: *Major histocompatibility complex*
- NIH: *National Institute of Health*
- NK: *Natural Killer*
- NLS: Sinal de localização nuclear
- O.P.D.: o – fenildiaminobenzeno

- ORFs: *Open Reading Frames*
- PBS: Tampão fosfato salino
- PCR: Reação em cadeia pela polimerase
- PCV: *Porcine circovirus*
- PCV-1: Circovírus suíno 1 (*Porcine circovirus 1*)
- PCV-2: Circovírus suíno 2 (*Porcine circovirus 2*)
- PCVAD: *Porcine circovirus 2 associated diseases*
- PDNS: *Porcine Dermatitis Nephropathy Syndrome*
- PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
- PMWS: *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*
- PRRSV: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*)
- PVDF: *Polyvinylidene fluoride*
- rCap PCV-2: Proteína recombinante do capsídeo do PCV-2
- Rep: Proteína de replicação do PCV-2
- RF dsDNA: Forma replicativa de DNA fita dupla
- RIA: Radioimunoensaio
- SD: Desvio padrão
- SDMS: Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno
- SDNS: Síndrome da Dermatite e Nefropatia suína
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
- SIV: *Swine influenza virus*
- SRDC: Pneumonias Associadas ao Complexo Respiratório do Suíno
- TTV: *Torque teno virus*
- UE: Unidades de ELISA

RESUMO

FAUSTO, Mariana Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2010. **Padronização de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para sorologia, detecção e quantificação do Circovírus suíno 2.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Leandro Licursi de Oliveira e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O Circovírus suíno 2 (PCV-2) é o principal agente causador da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), e está associado a diferentes síndromes que acometem esses animais. O termo PCVAD (*Porcine circovirus 2 associated diseases*) foi introduzido em 2006, para enquadrar todas essas doenças. Uma vez que estudos sorológicos são fundamentais para o monitoramento do vírus, o objetivo desse trabalho foi desenvolver ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção e titulação de anticorpos anti-PCV-2 e também para a quantificação viral, assim como da proteína recombinante do capsídeo do PCV-2 (rCap PCV-2) em extratos de *Escherichia coli*. Após a padronização da técnica, 29 amostras de soro negativos por ELISA indireto foram utilizadas para a determinação do *cutoff*. O ELISA qualitativo foi comparado com a Imunoperoxidase em Monocamada (IPMA), através da análise de 155 amostras de soro, pré-determinadas por IPMA, sendo 125 amostras positivas e 30 amostras negativas para anticorpos anti-PCV-2, no ELISA. Os testes apresentaram uma concordância de 98,70 % confirmando assim a alta sensibilidade e especificidade do ELISA relativa ao IPMA. No ensaio quantitativo, 20 amostras de soro tiveram o título determinado através do ELISA e este apresentou um maior limite de detecção de anticorpos do que o IPMA, em 18 das 20 amostras avaliadas. Para a quantificação da rCap PCV-2 presente em extratos de *E.coli*, um ELISA de captura foi desenvolvido. Foram utilizadas IgGs precipitadas a partir de soro policlonal de coelho anti-rCap PCV-2 como anticorpo de captura e as IgGs conjugadas com peroxidase como anticorpo de detecção. Uma curva-padrão foi obtida através da diluição seriada da rCap PCV-2 e o ensaio apresentou um limite de detecção na faixa entre 0,625 a 0,0097 µg/mL, que foi utilizado com sucesso para quantificar a proteína no extrato de *E.coli*. Assim espera-se que este teste seja também aplicado futuramente na quantificação do PCV-2 em amostras de campo.

ABSTRACT

FAUSTO, Mariana Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2010. **Standardization of enzyme immunoassay (ELISA) for serology, detection and quantification of porcine circovirus type 2.** Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, Leandro Licursi de Oliveira and Juliana Lopes Rangel Fietto.

Porcine circovirus 2 (PCV-2) is the major causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and is associated with different syndromes that affect the swine. The term PCVAD (Porcine circovirus associated diseases) was introduced in 2006 to gather many diseases. Since serological studies are essential for monitoring the virus, the aim of this study was to develop enzyme immunoassays (ELISA) for detection and titration of antibodies to PCV-2 and also for viral quantification as well as the recombinant protein capsid PCV-2 (rCAP PCV-2) in extracts of *Escherichia coli*. After the standardization of the technique, 29 negative serum samples in ELISA were used for determining the cutt off. The quantitative ELISA was compared with the Immunoperoxidase monolayer (IPMA), through analysis of 155 serum samples, pre-determined by IPMA, of which 125 samples were positive and 30 negative samples for antibodies to PCV-2, in ELISA. The tests showed a concordance of 98.70% confirming the high sensitivity and specificity of ELISA on the IPMA. In the quantitative assay, 20 serum samples had the title determined by ELISA and it showed a higher detection limit of antibodies than the IPMA in 18 of the 20 samples tested. To quantify the rCAP PCV-2 in extracts of *E.coli*, a capture ELISA was developed. Were used precipitated IgGs from polyclonal rabbit serum anti-rCap PCV-2 as capture antibody and the conjugated IgGs with peroxidases as detection antibody. A standard curve was obtained by serial dilution of rCap PCV-2 and the test showed a detection limit in the range of 0.625 to 0.0097 mg/mL, which was successfully used to quantify the protein in the extract of *E.coli*. Thus it is expected that this test is also applied in the quantification of future PCV-2 in field samples.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura possui grande importância no setor econômico brasileiro, uma vez que o país é atualmente o quarto maior exportador de carne suína do mundo. Diante desta posição de destaque, torna-se necessário uma maior atenção nos programas de sanidade das granjas, mantendo o plantel com adequado perfil sanitário.

O Circovírus suíno 2 (PCV-2), pertencente à família *Circoviridae* tem emergido como uma importante causa nas perdas de produção da indústria suinícola mundial por estar associado a várias doenças. O termo PCVAD (*Porcine circovirus 2 associated diseases*) foi introduzido em 2006 pela *American Association of Swine Veterinarians* (AASV), para resumir as diferentes manifestações clínicas relacionadas ao PCV-2, incluindo a Síndrome Multisistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), as Pneumonias Associadas ao Complexo Respiratório do Suíno (SRDC), a Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS) e as enterites e falhas reprodutivas associadas ao PCV-2 (Opriessnig et al., 2007).

Dados da literatura indicam que a proteína do capsídeo viral (Cap) é a porção mais imunogênica do PCV-2, consistindo em um antígeno interessante para estudos sorológicos e desenvolvimento de vacinas (Blanchard et al., 2003b). Os estudos sorológicos são fundamentais para monitorar a saúde do rebanho, formular protocolos de vacinação e determinar estratégias terapêuticas. Assim, eles são úteis para responder questões que ainda precisam ser esclarecidas para o desenvolvimento de novas gerações de vacinas contra o PCV-2, servindo como ferramenta para o controle de qualidade através do seu uso na quantificação de antígenos presentes em amostras vacinais.

O grupo do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA/BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa desenvolveu, em estudos anteriores, um eficiente sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* capaz de produzir a proteína recombinante do capsídeo do PCV-2 (rCap PCV-2). As propriedades antigênicas da rCap PCV-2 purificada foi confirmada, por meio da técnica de *Western blotting*, utilizando soro de suíno anti-PCV-2 e por vacinações em modelos murinos (Dados não publicados, em processo de depósito de patente). Além disso, uma vacina recombinante contra o PCV-2 vem sendo desenvolvida pelo grupo.

Neste sentido, torna-se necessário desenvolver e validar uma metodologia própria para o diagnóstico sorológico dos animais que serão imunizados e para a quantificação da rCap PCV-2 presente nessas amostras vacinais. Assim, este trabalho teve como objetivo a utilização da rCap PCV-2 no desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a sorologia, detecção e quantificação do PCV-2 e dessa proteína presente em extratos vacinais de *E.coli*. Tais metodologias foram desenvolvidas e validadas com sucesso neste trabalho. A abordagem deste assunto representa uma estratégia necessária, pois contribuirá com o projeto de desenvolvimento da vacina recombinante contra o PCV-2 e com os demais projetos desenvolvidos atualmente pelo grupo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Circovirose suína

2.1.1. O *Circovírus suíno* e seus aspectos moleculares

O *Circovírus suíno* (PCV) é classificado dentro da família *Circoviridae* (Lukert et al., 1995). Ele foi descoberto como contaminante de células PK15 em meados da década de 70 (Tischer et al., 1974) e considerado com o não patogênico, uma vez que, a inoculação de suínos com células PK15 contaminadas com vírus não causava doença nos animais (Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986). Em 1997, no Canadá, outra espécie de PCV foi encontrada e associada às perdas causadas pela doença em suínos (Allan et al., 1998). A subsequente caracterização do vírus isolado de suínos sintomáticos revelou que se tratava de outra espécie, porém geneticamente relacionada com a não patogênica derivada de células PK15, previamente conhecida (Fenaux et al., 2000). O vírus patogênico recém descoberto a partir de suínos doentes foi designado como PCV-2 e o vírus não patogênico derivado de células PK15 foi chamado de PCV-1 (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998), sendo estes formados por cerca de 68-76% de sequências de nucleotídeos idênticas (Fenaux et al., 2004a).

Os vírus da família *Circoviridae* afetam aves, suínos e outros mamíferos, e são caracterizados por possuírem um dos menores genomas entre os vírus que infectam vertebrados. Esta família é dividida atualmente em dois gêneros: (i) o gênero *Gyrovirus*, constituído exclusivamente do vírus da anemia das galinhas, e (ii) o gênero *Circovírus* constituído pelo Torque teno vírus que infecta humanos (TTV), pelo vírus da doença das penas e bico dos psitacídeos, por circovirose de outras espécies aviárias e pelo PCV em suínos (Studdert, 1993).

O PCV-2 é um vírus pequeno, com 17 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, não envelopado, DNA fita simples circular de 1,76 Kb, apresenta um coeficiente de sedimentação de 57S quando comparado com o coeficiente de sedimentação do enterovírus bovino (Allan et al., 1994) e é capaz de sedimentar em um gradiente de CsCl na faixa de densidade de 1,33-1,34 mg/mL (Tischer et al., 1974). O PCV-2 possui seis potenciais janelas abertas de leitura (ORFs -

Open Reading Frames - Figura 1), sobrepostas, com ausência de regiões intergênicas, e que codificam proteínas putativas maiores que 6 kDa (Mankertz et al., 1997). Apenas três destas ORFs são descritas atualmente (Hamel et al., 1998), sendo a ORF1 e a ORF2 as duas principais e representam 93% do genoma do PCV-2 (Meehan et al., 2001; Mankertz et al., 1998).

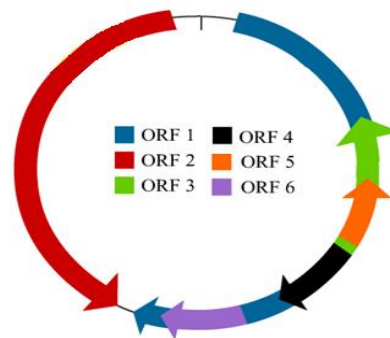


Figura 1. Genoma do PCV-2 esquematizado identificando as 6 ORFs. No sentido senso está a ORF1 (em azul), a ORF2 (em vermelho) no sentido anti-senso, e a ORF3 (em verde) sobreposta dentro da ORF1 no sentido anti-senso. As ORFs putativas 4, 5 e 6 foram identificadas por meio de ferramentas de bioinformática e ainda estão sendo caracterizadas (Vidigal, 2008).

A ORF1 (gene *rep* com 942 pb, sentido positivo) codifica duas proteínas replicases de 35,7 kDa e 17 kDa, conhecidas como Rep e Rep' respectivamente, ambas envolvidas na replicação viral. O gene *rep* é altamente conservado entre o PCV-1 e PCV-2 com cerca de 83% de identidade nas sequências nucleotídicas. Já a ORF2 (gene *cap* com 702 pb, sentido negativo) codifica a proteína do capsídeo (Cap) de 27,8 kDa, sendo esta a única proteína estrutural do vírus, e considerada como a proteína mais imunogênica, uma vez que contém os epitopos antigênicos imunodominantes (Fenaux et al., 2004b), responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes no hospedeiro contra o PCV-2 (Fort et al., 2007). O gene *cap* possui cerca de 67-70% de identidade entre o PCV-1 e o PCV-2 (Mankertz et al., 2004). A ORF3 codifica uma proteína envolvida no mecanismo de apoptose celular pela ativação intracelular da via caspase durante a patogênese causada pelo vírus (Karuppanan et al., 2009; Liu et al., 2007), entretanto esses dados ainda não foram confirmados (Juhan et al., 2010).

Estudos de genotipagem do PCV-2 dividiram o vírus em dois grandes grupos que foram designados como: PCV-2 grupo 1 ou PCV-2b e PCV-2 grupo 2 ou PCV-2a; e 8 subgrupos: 1A a 1C e 2A a 2E (Olvera et al., 2007; Grierson et al., 2004; Larochelle et al., 2002). Os isolados PCV-2b demonstraram possuir uma origem predominantemente europeia enquanto que os isolados PCV-2a possuem uma origem norte americana (Ramamoorthy e Meng, 2009). No entanto, ambos os grupos estão intimamente relacionados possuindo cerca de 93-99% de identidade nas sequências de nucleotídeos (Fenaux et al., 2000).

Trabalhos descritos na literatura demonstraram que genótipos de PCV-2 associados com os sinais clínicos pertencem ao grupo 1A e genótipos associados à ausência desses sinais pertencem ao grupo 2 (Olvera et al., 2007). Entretanto, a presença de mais de uma linhagem de PCV-2 ao mesmo tempo em suínos foi recentemente confirmada. Foi também constatado que a recombinação do gene *rep* pode ocorrer entre as linhagens coexistentes (Hesse et al., 2008). Estudos isolaram PCV-2a em circulação entre os anos de 1993 e 1996 em rebanhos na Dinamarca, seguida por isolamentos posteriores de PCV-2b, sugerindo que mudanças no genótipo dos isolados de PCV-2 ocorrem em uma determinada área geográfica com o passar do tempo (Dupont et al., 2008).

No Brasil, levantamento sobre a diversidade genética e geográfica do vírus tem sido realizado. Em um estudo foram analisadas, por métodos filogenéticos e filogeográficos, 30 sequências nucleotídicas da ORF2 de amostras de seis estados brasileiros e comparadas com outras sequências do *GenBank*. Os resultados demonstraram que a maioria dos isolados brasileiros parecem ser derivados de uma única introdução (Chiarelli-Neto et al., 2009). Em outro estudo, seis isolados brasileiros do PCV-2 foram sequenciados, analisados e comparados com outras 35 sequências, sendo 24 de outros países e 17 do Brasil. A análise filogenética desses isolados mostrou que ambos os grupos de PCV-2 estão presentes na população de suínos no país, entretanto não existe uma correlação geográfica clara entre estes (Ciacci-Zanella et al., 2009).

2.1.2. Epidemiologia

Desde a descoberta do PCV-1 como contaminante das células PK15 em 1974 (Tischer et al., 1974) e a identificação subsequente do PCV-2 como a causa da SMDS no Canadá em 1997 (Meehan et al., 1998), ambos os vírus foram detectados em uma distribuição mundial.

A presença do PCV-2 nos rebanhos de países afetados como o Canadá, Espanha, Taiwan e a Austrália têm variado entre 40 e 80% (Opriessnig et al., 2007). No entanto, como a prevalência do vírus é determinada pela presença do antígeno viral ou do DNA viral em tecidos, a dificuldade na obtenção de dados exatos sobre a sua incidência pode ser devido a diferenças na sensibilidade dos métodos de detecção utilizados e também uma identificação cruzada entre o PCV-1 e o PCV-2 em estudos preliminares (Opriessnig et al., 2007).

No Brasil, a EMBRAPA Suínos e Aves /Concórdia /SC, identificou pela primeira vez o PCV-2 associado à SDMS em 1999 (Ciacci-Zanella et al., 2001). Porém, um estudo recente (Silva Júnior et al., 2009) confirmou-se a presença do DNA do PCV-2 pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real em arquivos teciduais de suínos desde 1978, comprovando assim, a presença do vírus no Brasil bem antes do primeiro isolamento viral associado à SDMS, realizado no Canadá (Ellis et al., 1998).

O número de descrições de PCVAD vem crescendo nos últimos anos, o que indica que o vírus encontra-se amplamente disseminado no país sendo este diagnosticado em Goiás (Sobestiansky et al., 2002), Minas Gerais (Monerrat et al., 2003; Pinto et al., 2003), São Paulo (Castro et al., 2003), Rio Grande do Sul (Barcellos e Pescador, 2003), Espírito Santo (Chiarelli-Neto et al., 2006) e Rio de Janeiro (França et al., 2005).

O PCV-2 é altamente contagioso e resistente. Persiste a baixos valores de pH, clorofórmio e temperaturas de 70°C por 15 minutos, ao congelamento, à luz ultravioleta e a maioria dos desinfetantes convencionais (Allan et al., 1994). Essa sua estabilidade no ambiente desempenha um papel importante na sua transmissão (Shibata et al., 2003).

O vírus pode ser eliminado pela maioria das secreções e excreções dos suínos infectados (Krakowka et al., 2005), com ou sem sinais clínicos de PCVAD, apesar de animais doentes eliminarem uma carga viral maior do que animais infectados e clinicamente saudáveis

(Segales et al., 2005). A transmissão viral é predominantemente pela via oronasal, entretanto, partículas virais também podem estar presentes no colostro (Shibata et al., 2006) e sêmen (McIntosh et al., 2006b) sendo estas outras importantes vias de contaminação.

A eficiência da transmissão horizontal na disseminação do PCV-2 foi comprovada ao observarem, em animais provenientes de rebanhos não contaminados, o aparecimento de sinais clínicos de SDMS após o contato direto com animais originados de rebanhos afetados pela doença (Kristensen et al., 2009). A transmissão vertical do vírus via transplacentária também foi verificada em estudos com porcas infectadas naturalmente ou experimentalmente devido a uma viremia materna (Park et al., 2005). Além disso, é importante levar em consideração que a genética do hospedeiro pode influenciar na susceptibilidade do animal às PCAD (Opriessnig et al., 2007).

2.1.3. Replicação viral

Devido à capacidade de infectar células de diferentes origens, o PCV-2 se distribui de forma generalizada nos tecidos de animais infectados (Opriessnig et al., 2006; Allan e Ellis, 2000). Apesar de a replicação viral apresentar características variáveis dependentes do tipo de células envolvidas, uma característica comum a todas elas é o aumento da expressão da proteína Cap e Rep. A atividade endocítica é importante para a internalização do vírus, mas não garante o início do ciclo replicativo (Steiner et al., 2008).

Tem sido proposto que o PCV replica no núcleo de células infectadas via mecanismo de círculo rolante, produzindo uma forma replicativa de DNA fita dupla (RF dsDNA). A replicação depende da transferência do genoma viral ao núcleo no início da fase G1 da mitose, pois quando transferido no final desta fase, não ocorre replicação viral na fase S subsequente (Tischer et al., 1987). A região entre os genes *cap* e *rep* é extremamente conservada e composta por 111pb. Ela contém a origem de replicação do PCV e o sítio de atuação da proteína Rep (Mankertz et al., 1997).

A replicação genômica do PCV depende da expressão da cadeia total da proteína Rep e da sua isoforma gerada pelo mecanismo de *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA)

oriundo da transcrição da ORF1 (Rep`), que se ligam a essa estrutura de grampo. A estrutura tridimensional do grampo é importante para a ligação das proteínas da replicação (Steinfeldt et al., 2001), entretanto, apesar de algumas substituições de nucleotídeos serem permitidas, a sua sequência é indispensável para o processo de replicação (Cheung, 2004).

2.1.4. Características estruturais e funcionais da Cap PCV-2

A Cap é a proteína estrutural e imunogênica do PCV-2, codificada pela ORF2, com uma massa molecular aproximada de 28 kDa (Hamel et al., 1998). O capsídeo desse vírus possui estrutura similar ao de outros vírus da família *Circoviridae*, e é composto por uma estrutura icosaédrica contendo 60 monômeros dessa proteína sendo a mesma agrupada em 12 pentâmeros (Crowther et al., 2003).

A Cap PCV-2 é bastante básica, tendo ponto isoelétrico (pI) de 10,8 e uma carga positiva em pH fisiológico. Essa carga se deve em grande parte à sua porção básica amino-terminal representada pelos primeiros 46 resíduos de aminoácidos, sendo que aproximadamente 40% dessa região é composta por resíduos de arginina e está envolvida com a interação com as cargas negativas do DNA viral empacotado durante a montagem do vírus, indicando que esta região básica deve estar voltada para o lado interno da partícula viral (Lekcharoensuk et al., 2004; Crowther et al., 2003; Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1992). Estudos também demonstraram que 41 resíduos de aminoácidos desta região N-terminal básica fazem parte do sinal de localização nuclear (NLS) da proteína (Liu et al., 2001).

A proteína do capsídeo do PCV-1 e do PCV-2 compartilha menos de 70% de identidade de nucleotídeos, entretanto, quando a comparação é feita somente entre os diversos isolados de PCV-2, a Cap mostra-se altamente conservada (Kamstrup et al., 2004; Mankertz et al., 2004). Os dois grandes grupos (1 e 2) em que o PCV-2 foi recentemente dividido foram definidos utilizando a Cap como marcador filogenético e epidemiológico do vírus (Olvera et al., 2007).

Estudos sobre o mapeamento de epitopos antigênicos demonstraram que existem vários epitopos imunodominantes dentro dessa proteína e que estes, tratam-se de regiões

imunoreativas específicas para anticorpos de suíno anti-PCV-2 (Shang et al., 2009; Mahe et al., 2000). Soros de suínos infectados com o vírus são capazes de interagir especificamente com esta proteína mostrando o seu potencial tanto para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico quanto para a produção de vacinas (Liu et al., 2004; Nawagitgul et al., 2002).

2.1.5. Construções recombinantes utilizando a Cap PCV-2

A expressão da Cap recombinante foi primariamente viável em um sistema de expressão em baculovírus, e utilizada na detecção de anticorpos específicos para o PCV-2 (Liu et al., 2004; Blanchard et al., 2003a). Entretanto, a produção da proteína recombinante em sistema eucariótico possui um alto custo de produção (Perez-Martin et al., 2008).

O sistema procarioto de expressão também tem sido descrito, porém com algumas limitações. A dificuldade em expressar a proteína codificada pela ORF2 em células de *E.coli* BL21 é provavelmente devido à composição específica de aminoácidos que fazem parte do NLS (Zhou et al., 2005). Estudos realizados com a ORF2 completa e sem o NLS demonstraram que o excesso de arginina, e de outros aminoácidos com diferentes códons no NLS, é uma importante razão para a dificuldade de expressão desta proteína viral (Trundova e Celer, 2007). A arginina exibe uma diferença significativa no uso de códon entre organismos virais e procarióticos, logo RNAs transportadores (tRNA) apropriados são, dessa forma, raros em linhagem de *E.coli* comuns de expressão. Esta falha conduz à terminação prematura da síntese de proteína. Sendo assim, é necessário uma bactéria que contenha cópias extras de genes que codificam tRNAs raros para que haja um bom rendimento na expressão da Cap, como a *E.coli* BL21 códon plus (Trundova e Celer, 2007). Além disso, já foi demonstrado que a deleção de todo o domínio do NLS conduziu a expressão de uma quantidade significativa da proteína (Zhou et al., 2005).

Uma proteína purificada é uma ferramenta muito importante no estudo de infecção de um determinado patógeno. Por ser uma proteína estrutural e altamente imunogênica, a rCap PCV-2 expressa em sistemas heterólogos vem sendo utilizada em ensaios sorológicos, demonstrando eficiência no monitoramento viral e no desenho de novos candidatos vacinais (Perez-Martin et al., 2008).

2.1.6. Patogênese e Síndromes Clínicas.

As PCVAD incluem todas as manifestações clínicas associadas ao PCV-2 (Opriessnig et al., 2007). A primeira a ser caracterizada foi a Síndrome Multisistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), conhecida mundialmente como *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) (Segales e Domingo, 2002; Allan et al., 2000). No entanto, sabe-se que nem todos os suínos infectados com PCV-2 irão desenvolver a SMDS e que a incidência desta é maior quando estão presentes patógenos virais e bacterianos co-infectantes (Albina et al., 2001). O alto e persistente nível de replicação do PCV-2 é um fator crucial na patogênese dessas doenças. A habilidade desses pequenos vírus em persistir e replicar por longo tempo indica uma falha na resposta imunológica do seu hospedeiro em reconhecer e eliminar eficientemente partículas virais ou células infectadas com o vírus nesses organismos (Meerts et al., 2005).

Atualmente, a SMDS afeta suínos em fase de crescimento e terminação e raramente ocorre em leitões com uma a três semanas de idade, devido à proteção conferida pelos anticorpos maternos (McIntosh et al., 2006a). Os primeiros sinais clínicos de SMDS incluem febre, letargia, perda de peso, aumento dos linfonodos, dispnéia e icterícia (Chae, 2004). As lesões primárias da SMDS estão associadas ao sistema linfático. Microscopicamente, os linfonodos aumentados mostram-se atróficos com depleção linfóide, perda da arquitetura e infiltração por histiócitos e células gigantes com corpos de inclusão basofílicos. Essas lesões estão presentes nos linfonodos inguinal superficial, mesentérico, mediastino, submandibulares e em placas de Peyers (Fenaux et al., 2002). A atrofia tímica é outra característica da SMDS. Nos pulmões, pneumonia intersticial e bronquiolite com infiltrados mononucleares são observados enquanto que os tecidos hepáticos podem apresentar alterações inflamatórias e apoptóticas com infiltrado de células mononuclear no parênquima (Harms et al., 2001).

A Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS), conhecida mundialmente como *Porcine Dermatitis Nephropathy Syndrome* (PDNS) é outra manifestação associada ao PCV-2. Apesar dessa síndrome apresentar uma menor incidência, quando comparada com a SMDS, animais afetados com a SDNS, possui altos níveis de mortalidade (Ramamoorthy e Meng, 2009). Os sinais clínicos incluem lesões de pele vermelho púrpura, nefrite intersticial e glomerular, vasculite e a deposição de imunocomplexos no tecido renal. Embora haja associação dos altos níveis de anticorpo para PCV-2 no desencadeamento de uma

hipersensibilidade do tipo III em casos de SDNS, ainda não existe prova experimental (Krakowka et al., 2008). Recentemente, a SDNS foi reproduzida pela infecção experimental com o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* - PRRSV) e o TTV em suínos livres de PCV-2, indicando que esta síndrome não está sempre associada o vírus (Krakowka et al., 2008).

Falhas reprodutivas também estão relacionadas à infecção pelo PCV-2 em rebanhos afetados, onde a presença do vírus em tecidos cardíacos de fetos abortados tem sido frequentemente registrada (Park et al., 2005).

O PCV-2 também foi associado com sintomas de manifestação nervosa como tremores congênitos e pneumonia necrotizante proliferativa (Larochelle et al., 2002).

As PCVAD raramente ocorrem em suínos apenas infectados com PCV-2. As taxas de ocorrência de patógenos co-infectantes associados incluem: PRRSV (41%), Parvovirus suíno (15%), *Mycoplasma hyopneumoniae* (27%), septicemia bacteriana (10%), pneumonia bacteriana (6%) e vírus da influenza suína (SIV) (4%). O PCV-2 sozinho causa doença em apenas 1% dos casos (Grau-Roma et al., 2008). Entretanto, não se sabe se o efeito imunossupressor da infecção pelo PCV-2 facilita a co-infecção ou se os patógenos que co-infectam auxiliam na indução da SMDS (Opriessnig et al., 2007).

A interação do PCV-2 com o sistema imune do hospedeiro é provavelmente o fator mais importante na patogênese do PCV-2 por produzir um efeito imunossupressor. Tipicamente, destruição de folículos linfóides, depleção de linfócitos associada com uma redução no número de células dendríticas interfolicular, células interdigitais, células B, células *Natural Killer* (NK), células T, linfócitos T CD4+ e TCD8+ e um aumento do número de monócitos e granulócitos, são observados em animais afetados. O PCV-2 persiste em células dendríticas sem alterar a sua função imunológica. No entanto, ele prejudica a produção de interferon (IFN γ) interferindo desta forma na resposta imune inata (Vincent et al., 2005). A verificação de marcadores de superfície de linfócitos T em suínos com e sem SMDS revelou o estado de ativação com níveis aumentados e expressão precoce de MHCII nas células B e T e aumento nos níveis de expressão de CD25 (receptor de interleucina 2 – IL2) em suínos doentes (Grierson et al., 2007).

Apesar da patologia associada, suínos infectados com PCV-2 parecem produzir uma forte resposta de anticorpos específicos para PCV-2, mesmo que essa resposta não seja completamente protetora e esses animais possam continuar virêmicos por várias semanas (McIntosh et al., 2006b). Uma resposta típica dos suínos no campo, soropositivos para PCV-2, é caracterizada pela diminuição nos títulos dos anticorpos maternos entre 3 a 11 semanas de idade, aumento do título com 15 semanas e posterior persistência no título de anticorpos para PCV-2. Acredita-se que, embora não seja a imunoglobulina M (IgM) o isotipo neutralizante, ela indica uma infecção ativa e funciona através de uma interferência conformacional com o ataque viral às células do hospedeiro (Fort et al., 2007).

Testes de vacinação e estudos de neutralização *in vitro* têm demonstrado que existe uma correlação direta entre título de anticorpo alcançado e proteção a proteção (Song et al., 2007). Entretanto, recentemente, foi demonstrado que animais afetados clinicamente podem apresentar níveis de anticorpos totais anti-PCV-2 significativamente mais baixos do que os animais saudáveis, mas também podem apresentar altos títulos de anticorpos totais e ausência de anticorpos neutralizantes (Fort et al., 2009; Fort et al., 2007).

Sabe-se que existe uma correlação entre a ausência ou títulos baixos de anticorpos neutralizantes e um aumento na taxa de replicação do PCV-2 e, conseqüentemente, no desenvolvimento da SDMS. Em tais estudos, a queda da viremia ocorre simultaneamente com o aumento do título de anticorpos neutralizantes, sugerindo que a circulação do vírus na corrente sanguínea é reduzida pela neutralização mediada por anticorpos, sendo esse um importante mecanismo de controle e limitação da infecção (Fort et al., 2007; Meerts et al., 2006). Entretanto, a existência de anticorpos neutralizantes e DNA viral têm sido observadas em animais acometidos ou não pela SDMS, o que sugere que apenas anticorpos neutralizantes não sejam suficientes para a eliminação viral (Fort et al., 2007).

2.1.7. Diagnóstico

Uma vez que o PCV-2 pode ser detectado em animais saudáveis (Calsamiglia et al., 2002; Allan and Ellis, 2000), o diagnóstico definitivo das PCVAD é baseado em três critérios obrigatórios: 1- detecção do antígeno ou do ácido nucléico viral; 2- presença de lesões macro e

microscópicas; 3- sinais clínicos causados pela infecção (Allan and Ellis, 2000; Allan et al., 1999b). Não há efeito citopático causado pelo PCV-2 em cultivo celular, assim, os métodos de diagnóstico que são rotineiramente utilizados incluem: Hibridização *in situ* (IHS), Imuno Histoquímica (IHC), Ensaio de Imunofluorescência (IF) (Allan et al., 1999a; Ellis et al., 1999; Ellis et al., 1998; Morozov et al., 1998), assim como a PCR (Allan et al., 1999a; Larochelle et al., 1999).

2.1.8. Controle e prevenção

A combinação de boas práticas de manejo, vacinação e vigilância do rebanho, como entre outras medidas, a diminuição do estresse dos animais, a redução na mistura de lotes, e a adoção de vazios sanitários, tem se mostrado eficientes para controlar as PCVAD (Madec et al., 2008). Assim, é importante determinar o nível de imunidade ótimo de cada rebanho trabalhando de maneira coordenada para se alcançar os níveis de proteção desejados (Ramamoorthy e Meng, 2009).

Vacinas disponíveis atualmente contra o PCV-2 são eficientes na prevenção de surtos da PCVAD e podem ser usadas em leitões ou em porcas. A primeira vacina disponível mundialmente e no Brasil foi a Circovac[®] da Merial que contém partículas virais de PCV-2 inativadas, sendo indicada para porcas e marrãs, objetivando induzir a transferência da imunidade passiva protetora através do colostro para os leitões (Pejsak et al., 2009).

Outras três vacinas desenvolvidas para leitões de três a quatro semanas de idade estão disponíveis atualmente no Brasil e no mundo, sendo elas a vacina Ingelvac[®] CircoFLEX[™] do laboratório Boehringer Ingelheim e a vacina Circumvent[™] PCV da Intervet Inc, Whitehouse Station, USA, que baseiam-se na expressão da Cap PCV-2 em baculovírus, e a vacina Suvaxyn[®] PCV-2 One dose da Fort Dodge/ Pfizer Animal Health, USA, que contém partículas virais quiméricas PCV1-2 inativadas (Fenaux et al., 2004a). Estas vacinas comerciais têm mostrado um efeito protetor através da diminuição do número de animais com as doenças associadas e redução da mortalidade, além da melhora na conversão alimentar e diminuição da frequência de co-infecção em estudos a campo (Pejsak et al., 2009; Opriessnig et al., 2007).

Entretanto, outros candidatos vacinais vêm sendo avaliados atualmente buscando eficácia e diminuição dos custos de produção, como uma vacina de DNA recombinante expressando a proteína estrutural do PCV-2, que demonstrou ser capaz de induzir uma resposta humoral e celular ao ser testada em camundongos (Silva Júnior et al., 2009). Assim como este, outros candidatos vacinais também têm sido desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Infectologia Molecular Animal/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa - UFV, como a construção de um adenovírus recombinante e extratos vacinais contendo rCap PCV-2 expressa em sistemas heterólogos (em patenteamento).

2.2. Testes sorológicos

Embora a sorologia para PCV-2 não tenha valor para o diagnóstico, ela pode ser utilizada para monitorar a infecção através de estudos transversais ou longitudinais dentro do rebanho (Opriessnig et al., 2007). Estudos demonstram diferentes perfis sorológicos sugerindo diferentes exposições e circulação viral. Assim a caracterização do perfil sorológico pode fornecer informações essenciais para adaptações aos programas de vacinação que consideram o nível e a diminuição de anticorpos passivos, assim como a idade que os sinais clínicos aparecem no rebanho melhorando dessa forma as medidas de controle, de acordo com as características individuais de cada rebanho (Gerber et al., 2009).

Diferentes testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos. A primeira geração de métodos de diagnóstico para o PCV-2 inclui aqueles baseados em cultivos celulares infectados com a partícula viral, como o ensaio de Imunoperoxidase em Monocamada (IPMA) (Rodriguez-Arriola et al., 2000), Imunofluorescência Indireta (IFI) (Allan et al., 1998) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Walker et al., 2000). A segunda geração de testes sorológicos desenvolvidos consistem em ensaios de ELISA baseados na rCap PCV-2 como antígeno. Essa proteína tem sido expressa em vários sistemas como em *E coli* (Shang et al., 2008; Silva Júnior, 2008; Wu et al., 2008) e em Baculovirus (Blanchard et al., 2003b). ELISAs baseados em antígenos recombinantes são mais simples que outros métodos de diagnósticos como IPMA, pois podem ser automatizados, além de serem rápidos e não requerem o cultivo viral (Perez-Martin et al., 2008).

Uma nova estratégia de expressão descrita foi baseada na expressão da rCap PCV-2 em larvas de insetos *Trichoplusia* injetadas com baculovírus recombinantes. A principal vantagem desse sistema baseia-se em um alto rendimento da proteína recombinante sem necessidade de condições estéreis, além do menor custo de produção (Perez-Filgueira et al., 2007; Perez-Martin et al., 2007).

2.2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os testes imunoenzimáticos do termo em inglês *Enzyme immunoassay* (EIA) ou *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) surgiram no final dos anos 1960 a partir do RIA (radioimunoensaio) com a observação de que tanto o anticorpo como o antígeno poderia ser adsorvido em uma superfície sólida e ainda participar de ligações específicas de alta afinidade (Nunes, 2005). O processo de adsorção facilitou o processo de separação de antígenos livres e ligados, uma situação que se revelou difícil para muitos antígenos com o RIA. O termo ELISA foi aplicado a uma ampla variedade de imunoensaio, alguns dos quais não se empregam enzimas e alguns dos quais não requerem a separação dos antígenos livres e ligados. Entretanto, uma característica particular de todos estes ensaios continua sendo a utilização de anticorpos para detectar o antígeno (Crowther, 1995).

O ELISA tornou-se extremamente útil, pois permite reconhecer e, ou, quantificar rapidamente, um antígeno ou anticorpo em um grande número de amostras. Outras superfícies sólidas surgiram tais como nitrocelulose e *polyvinylidene fluoride* (PVDF) para *Blotting* (outra variação do ELISA, embora com uma baixa capacidade de quantificação), mas o ELISA permanece popular devido à sua facilidade de execução e automação, precisão e da disponibilidade imediata de reagentes de baixo custo. Assim, principais vantagens do ELISA incluem: simplicidade, rapidez, sensibilidade, adaptabilidade, baixo custo, aceitabilidade, segurança e disponibilidade (Crowther, 1995). No entanto, uma limitação da técnica de ELISA é que ela proporciona informações sobre a presença de um determinado antígeno, mas nenhuma informação sobre as suas propriedades bioquímicas, tais como peso molecular, ou a sua distribuição espacial em um tecido (Protein Research Products, 2009).

O princípio básico do ELISA consiste de uma reação imunológica (antígeno-anticorpo) seguida de uma etapa com antígeno ou anticorpo conjugado com enzima, um substrato e uma substância reveladora (Davies et al., 1990). O anticorpo é o fator determinante na especificidade e sensibilidade do ensaio, assim, quanto maior sua interação com o antígeno, uma menor concentração deste pode ser detectada. Portanto, um fator limitante da técnica é a especificidade de ligação ou a reação cruzada do anticorpo com demais proteínas que não seja a proteína alvo (Crowther, 2001).

Existem vários sistemas de ELISA, dependendo de qual reagente é inicialmente adicionado para fixar-se na placa e qual outro reagente subsequente será adicionado, o que permite uma grande versatilidade possível de adaptações do ELISA e suas aplicações. Os três sistemas básicos utilizados em ELISA são: ELISA direto, ELISA indireto e ELISA sanduíche ou captura. Cada um desses ensaios pode ainda ser adaptado para um formato competitivo e não competitivo. A característica do formato competitivo é a combinação de quantidades não conhecidas de um antígeno introduzido em uma amostra e do antígeno de referência, ambos competindo para se ligar a um número limitado de anticorpos. Entretanto, esse ensaio pode ser realizado, tanto com o antígeno como com o anticorpo adsorvido na placa.

O ELISA indireto é extensivamente utilizado para a detecção e titulação de anticorpos específicos a partir de amostras de soro. A especificidade do ensaio é determinada pelo antígeno aderido à placa que deve ser altamente purificado e caracterizado.

O ELISA de captura mensura quantidades de antígenos entre duas camadas de anticorpos. O antígeno é fixado nos poços da microplaca através de anticorpos específicos (anticorpos de captura) e um segundo anticorpo (anticorpo de detecção) é adicionado, podendo este ser idêntico ao anticorpo de captura desde que seja diretamente conjugado. A técnica oferece uma vantagem para a quantificação dos antígenos sobre os ensaios indiretos, uma vez que a fixação direta dos antígenos na superfície da placa é na maioria das vezes, não linear e desproporcional a quantidade de proteínas nas amostras. Tal fato é agravado se proteínas contaminantes estão presentes com o antígeno, como por exemplo, componentes do soro, já que eles também competem pela superfície da placa. Como o anticorpo de captura é específico, a ligação do antígeno é proporcional à concentração destes aderida na placa. Assim, o ensaio proporciona uma boa reprodutibilidade nos resultados onde a quantificação é requerida. Desta

maneira, a principal vantagem do ELISA de captura é que as amostras não precisam estar purificadas e nem estar em altas concentrações para serem analisadas (Crowther, 1995).

A quantificação do antígeno presente em uma amostra pode ser obtida através da construção de uma curva padrão utilizando um antígeno de referência. Para isso, nos poços contendo anticorpos de captura aderidos na superfície sólida, alíquotas conhecidas e de concentrações crescentes do antígeno de referência devem ser adicionadas, seguida da adição dos anticorpos de detecção marcados para gerar a curva. Para quantificar amostras desconhecidas, deve-se, portanto comparar a leitura de densidade óptica (DO) obtida de várias diluições das alíquotas não conhecidas, com a da curva padrão. Em uma situação ideal da atividade gerada por essas diluições, as mesmas podem ser paralelas às diluições feitas para a construção da curva padrão, caso contrário, deve-se diluir ainda mais a amostra (Protein Research Products, 2009).

2.2.2. Utilização do ELISA na validação de vacinas comerciais

As vacinas inativadas, embora não apresentem as mesmas vantagens das vacinas atenuadas, quanto à intensidade e ao tipo de resposta imune, possuem a vantagem de serem inócuas, termoestáveis e mais seguras, uma vez que, algumas vacinas contendo vírus atenuados podem apresentar efeitos adversos decorrentes da replicação do vírus vacinal (Dragunsky et al., 2004). Todas as vacinas que estão disponíveis no mercado atualmente para o PCV-2 são inativadas.

Testes de segurança são realizados com a aplicação de doses elevadas dessas vacinas em modelos experimentais. São descritos também, testes de esterilidade e de controle da inativação onde o risco de escape para o meio ambiente precisa ser muito baixo, sendo considerado um risco aceitável (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2009). Entretanto, além da segurança, as vacinas inativadas precisam comprovar a sua imunogenicidade que pode ser avaliada em modelos animais. Os testes de imunogenicidade devem ser associados a ensaios de dose-resposta através da avaliação sorológica *in vivo*, determinando assim a potência da vacina. Por outro lado, ensaios mais frequentes utilizam metodologias *in vitro* para a quantificação de antígenos virais, onde o teste de ELISA é

comumente a metodologia utilizada. Entretanto, alguns estudos demonstram a união dessas duas metodologias para quantificação de antígenos em vacinas inativadas (Dragunsky et al., 2004).

Como exemplo da utilização do ELISA, o Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health* - NIH) determina que a detecção do vírus da raiva em vacinas inativadas seja baseada na determinação da concentração da glicoproteína G assim como na confirmação da sua potência utilizando este ensaio (Fournier-Caruana et al., 2003). Outro exemplo importante é o da vacina inativada contra a hepatite A onde foram desenvolvidos ELISAs, que utilizam um anticorpo monoclonal contra uma proteína específica do vírus, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste. Além disso, é feito um estudo de imunogenicidade em camundongos (dose-resposta) e os dois resultados *in vivo* e *in vitro* são confrontados, sendo o conteúdo antigênico da vacina quantificado pelo ELISA e a potência dessa expressa em Unidades de ELISA (UE) (Dragunsky et al., 2004).

3. OBJETIVOS

- Padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA) sensível, rápido e seguro para detecção e titulação de anticorpos anti-PCV-2 em amostras de soro de suínos.
- Padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA) aplicável tanto para a quantificação viral como da proteína rCap PCV-2 presente em extratos vacinais de *E.coli*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), ambos localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) e também no Laboratório de Experimentação Animal localizado no Departamento de Nutrição e Saúde. Todos esses localizados na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

4.1. Preparação e purificação da proteína rCap PCV-2

Células competentes de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3)-RIL (Codon Plus) foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET Cap PCV-2 (Silva Júnior, 2008) contendo o gene da ORF2 do PCV-2 e, em seguida, induzidas com IPTG (Sigma-Aldrich) para a produção da rCap PCV-2. A proteína expressa foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Níquel (HIS-Select® Nickel Affinity – Sigma), pré-equilibrada em tampão de equilíbrio pH 7,5 (Fosfato 100 mM; NaCl 400 mM; Uréia 2 M; Imidazol 10 mM; e Triton x-100 0,1 %), por meio de uma coluna cromatográfica. Após a purificação, a proteína foi lavada com um tampão de pH 7,4 contendo tampão fosfato 20mM e Triton-X100 0,1% e posteriormente concentrada utilizando um dispositivo de filtração (Amicon Ultra® 15, 3000 Daltons, Millipore). A confirmação da purificação foi realizada pela análise em gel de SDS-PAGE 15% e a concentração determinada pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando o reagente da Bio-Rad e soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) para produção da curva padrão. A leitura foi realizada a 595 nm no espectrofotômetro *SP-2000 UV* (Spectrum), 10 minutos após a mistura da amostra com o reagente.

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) do termo em inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* foi utilizado para analisar a eficiência e qualidade da expressão e purificação da rCap PCV-2. A

amostra purificada foi misturada com tampão de amostra (Tris-Cl 45 mM, pH 6,8; glicerol 10%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,01%, 50 mM de β -mercaptoetanol) e, em seguida, fervida em banho-maria por 5 min a 95°C, aplicada e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). A rCap PCV-2 foi separada em um gel SDS-PAGE de 15%, utilizando um sistema de tampão Tris-glicina (Tris 25 mM e glicina 0,2 M) previamente descrito (Sambrook et al., 1989). A corrida eletroforética foi realizada fixando-se a voltagem em 100 V. Após a corrida, o gel foi corado (Commassie Brillante Blue R-250 0,1% (Sigma-Aldrich), ácido acético 9%, etanol absoluto 45%) por 4 h e descorado com solução descorante (ácido acético glacial 7,5% e etanol absoluto 25%) até a visualização da banda detectada por comparação com o marcador de peso molecular PageRule™ Unstained Protein Ladder (Fermentas) para a determinação do peso molecular.

4.3. ELISA indireto para diagnóstico sorológico

Microplacas de 96 poços (Nunc Immuno 96 MicroWell™ Plates MaxiSorp™) foram sensibilizadas com 100 μ L/poço da rCap PCV-2 diluída em tampão carbonato 0,05M (pH 9,6) durante a noite a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo Tween 20 (PBST - NaCl 0,9 %; Tween 20 0,05 % e fosfato 50 mM; pH 7,4), bloqueadas com 100 μ L/poço da solução de bloqueio (BSA 3% diluído em PBS) por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas com 100 μ L/poço de amostras de soro diluídas em solução de diluição (PBS contendo BSA 1%), sendo cada amostra testada em duplicata. Após uma nova lavagem, as placas foram incubadas com 100 μ L/poço do anticorpo secundário (anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma) diluídos em solução de diluição, e incubados por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e a reação colorimétrica foi desenvolvida utilizando 100 μ L/poço da solução contendo o substrato cromogênico [10 mL de tampão citrato fosfato 0,1M; pH 5; 4mg de O.P.D. (o-Phenylenediamine - C₆H₈N₂, 98%, MW 108,14 - Agros Organics); 5 μ L de H₂O₂ 30 %]. A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. A reação de desenvolvimento da cor foi paralisada com 50 μ L/poço de solução de H₂SO₄ 1,5 M e a presença de anticorpos foi determinada através da

leitura da absorvância a 492 nm (DO_{492nm}) em leitora de microplaca *Thermo Plate* (TP-Reader). Os controles negativos consistiram nos poços não sensibilizados com o antígeno.

4.3.1. Padronização do teste

A concentração ótima do antígeno e a diluição ótima do soro foram determinadas por procedimentos de titulação padrão *Checkerboard* (Crowther, 1995). A rCap PCV-2 foi imobilizada na microplaca de 96 poços, em 11 diluições seriadas na base 2 (10 $\mu\text{g/mL}$ a 0,0097 $\mu\text{g/mL}$), sendo adicionada inicialmente em todos os poços da coluna 1, seguindo com a diluição até a coluna 11 com o auxílio de uma pipeta multicanal. Como controle da técnica, foram adicionados apenas os diluentes nos poços correspondentes a coluna 12. Correspondentemente, o soro policlonal comercial de suínos anti-PCV-2 (*Anti-PCV Antiserum* - VMRD, Inc) foi adicionado a partir da diluição 1:50 até 1:6400, iniciando em todos os poços da linha A e sendo diluído serialmente, na base 2, até a linha H, totalizando 8 diluições. Para determinar a melhor diluição do conjugado, após as diluições do antígeno e do anticorpo terem sido padronizadas e fixadas, o anticorpo secundário (anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma) foi adicionado em uma microplaca nas diluições de 1:800 a 1:819200, sendo um total de 11 diluições seriadas na base 2, cada uma testada em duplicada. A diluição da rCap PCV-2 que apresentou uma maior interação com todas as diluições do soro testadas e que pode ser utilizada para detectar e quantificar o anticorpo foi determinada como a concentração ótima da proteína. O valor da DO_{492nm} do soro positivo e do conjugado mais próximo de 1,0 foi pontuado como condições ótimas de trabalho.

4.3.2. Amostras de soro

Um total de 155 amostras de soro de suínos saudáveis, mas naturalmente infectados, testadas previamente por IPMA para a detecção de anticorpos contra o PCV-2, sendo 125 consideradas positivas e 30 negativas para este teste, foram avaliadas nesse trabalho através do ensaio de ELISA. Essas amostras foram gentilmente cedidas pela Professora Zélia Lobato, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. O título das amostras

foi pré-determinado por IPMA sendo definidas como positivas aquelas que apresentaram o título maior ou igual a 20. Cada amostra correspondia a um volume aproximado de 500 a 1500 μL e as mesmas foram armazenadas a -20°C até o momento da sua utilização.

4.3.3. Ensaio sorológico

Todas as 155 amostras foram testadas em duplicata por ELISA na diluição de 1:800. O ponto de corte (*cut off*) do teste foi determinado pela média dos valores de absorvância das amostras negativas acrescida de duas vezes o desvio padrão (SD) dessas amostras, onde o número do SD utilizado na fórmula garante o nível de confiança do resultado (Crowther, 1995). Portanto, $\text{cut off} = \mu \text{ DO} + 2 \times \text{SD}$ (95,0% de confiança). Assim, as amostras que apresentaram uma $\text{DO}_{492\text{nm}}$ superior ao *cut off* foram consideradas positivas. A concentração da proteína e a diluição do anticorpo conjugado foram utilizadas na quantidade ótima determinada conforme descrito no item 4.3.1. Para validação e determinação dos parâmetros do teste foi calculada a sensibilidade e especificidade relativa ao IPMA, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo. A eficiência global do teste também chamada de precisão foi calculada e corresponde ao percentual de indivíduos corretamente classificados como saudáveis (Crowther, 2001; Madruga et al., 2001).

Verificou-se também o título de vinte amostras positivas de soro através de um ELISA indireto quantitativo. Essas amostras, testadas em duplicatas, foram diluídas seriadamente na base 2, utilizando-se 12 diluições (1:20 a 1:40960), assim como os controles positivos e negativos. O inverso do valor da maior diluição na qual a média dos valores de $\text{DO}_{492\text{nm}}$ de cada amostra estava acima do limiar de positividade foi considerado como o título da amostra. Os títulos determinados por ELISA foram comparados com os títulos pré-determinados por IPMA e o limite de detecção do ELISA/IPMA estabelecido.

4.4. Produção de um soro policlonal anti-rCap PCV-2

Um soro hiperimune foi obtido pela inoculação de um coelho da raça albina, macho, jovem, pela via subcutânea em três etapas, com intervalos de 15 dias entre elas, de 50 μg da

proteína rCap PCV-2 previamente purificada, juntamente com 150 μ L de Adjuvante Completo de Freud (Sigma) na primeira aplicação e Adjuvante Incompleto de Freud (Sigma) nas demais inoculações. Ao ser obtido um aumento no título de anticorpos, verificado por ensaios de imunodifusão em ágar (Mancini et al., 1965) após cada inoculação, um volume máximo de sangue foi coletado do animal por venopunção e cerca de 20 mL do soro devidamente separado foi armazenado a -80 °C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) e teve a aprovação da Comissão de Ética do mesmo sob número de registro: 43/2009 em 15/07/2009.

4.5. Precipitação de IgG pelo método do ácido caprílico

Para a precipitação das imunoglobulinas G (IgGs), o soro armazenado foi diluído em 4 volumes de tampão acetato (60mM pH 4,0) e foi adicionado ácido caprílico lentamente e sob agitação, na proporção de 25 μ L/mL, por 30 minutos e, em seguida, centrifugado a 10000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e misturado com PBS 10X (10 partes do sobrenadante para 1 parte de PBS) e o pH ajustado para 7,4. A solução foi então fracionada com sulfato de amônio (0,277g para cada mL de sobrenadante – equivale a 45% de saturação), agitada por 30 minutos e centrifugada a 3500 x g por 40 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado, a 4°C em um pequeno volume de PBS (1:10). Uma vez ressuscitadas, as IgGs foram dialisadas durante a noite a 4°C utilizando 2 litros de tampão PBS e, após esse período, elas foram aquecidas a 50-55°C em banho-maria por 20 minutos, centrifugadas a 5000 x g durante 20 minutos, aliquotadas e armazenadas a -20°C. A confirmação da precipitação foi analisada em gel de SDS-PAGE 10%, conforme descrito no item 4.2, e a determinação da concentração foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente da BioRad e BSA (Sigma) para produção da curva padrão. A leitura foi realizada a 595 nm no espectrofotômetro *SP-2000 UV* (Spectrum), 10 minutos após a mistura da amostra com o reagente. Os anticorpos obtidos por esse método foram utilizados como anticorpos de captura no ELISA de captura, também realizado nesse trabalho.

4.6. Conjugação da IgGs precipitadas com peroxidase

Após a determinação da concentração das IgGs precipitadas, estas foram conjugadas com peroxidase segundo Wilson e Nakane (1978). Para isso, 40 mg de peroxidase tipo VI (Sigma) foi dissolvida em 1 mL de água deionizada e, posteriormente, 200 µL de periodato de sódio 0,1M foi adicionado. A solução foi agitada por 20 minutos à temperatura ambiente protegida da luz e, em seguida, dialisada utilizando 1 litro de tampão acetato 0,001M, pH 4,4 por 18 horas a 4°C. Após esse período, 20 µL de tampão carbonato 0,2M pH 9,5 foram adicionados e 8 mg de IgG precipitada foram solubilizadas em 1 mL do mesmo tampão. Após agitação lenta por 3h à temperatura ambiente, 100 µL de solução de boroidreto de sódio 0,106 M foram adicionados e a solução foi deixada em repouso por 2 horas a 4°C. Em seguida, o conjugado foi precipitado sob agitação lenta a 4°C, com um volume igual de solução de sulfato de amônio 90%, 3,5M, pH 7,5 por 15 minutos. Após centrifugação a 4800 x g por 10 minutos, o precipitado foi lavado duas vezes com a solução de sulfato de amônio (90%; 3,5M; pH 7,2) sendo cada lavagem de 5 minutos. O precipitado foi solubilizado em 1 mL de PBS, pH 7,2 e dialisado exaustivamente contra 5 litros do mesmo PBS, durante 72 horas. Ao conjugado obtido, foi adicionada albumina bovina 1% (concentração final) e glicerina pH 7,2 v/v e a solução foi dividida em alíquotas de 200 µL para o armazenamento a - 20°C. Os anticorpos obtidos por esse método foram utilizados como anticorpos de detecção no ELISA de captura, também realizado nesse trabalho.

4.7. Avaliação da especificidade das IgGs precipitadas anti-rCap PCV-2

Para confirmar a especificidade das IgGs precipitadas com a rCap PCV-2 purificada e presente em extrato total de E.coli, foi efetuado um ensaio de Western blotting. Foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 15%, 2 µg da proteína rCap PCV-2 purificada, 5 µL do extrato total de E. coli positivo e 7,5 µL do extrato total de E. coli. negativo para a proteína, com densidade óptica (DO_{595nm}) de 0,7 e 0,5, respectivamente. Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™- C 27 extra (Amersham) em um sistema de transferência semi-seco (Semi Dry Blotter 10 – Biosystems). Quatro papéis filtros foram umedecidos em tampão anôdo 1 (0,3M de Tris, 20% metanol , pH

10,4) e dois com tampão ânodo 2 (0,025M de Tris, 20% metanol, pH 10,4). A membrana de nitrocelulose foi também umedecida em tampão ânodo 2 e colocada sobre os seis últimos papéis filtro em contato direto com o gel. Mais seis papéis filtro foram umedecidos em tampão cátodo (0,025M de Tris, 0,04M de ácido capróico, 20% de metanol, pH 9,4) e foram colocados sobre a membrana e o gel de poliacrilamida. O sistema montado foi submetido a 250 mA por 2 horas. Em seguida, a membrana foi corada por 10 min com solução de Ponceau (Vetec), lavada com água destilada e então bloqueada com BSA 3% diluído em TBS-T (Tris 25 mM, 0,9% de NaCl 0,1% de Tween-20, pH 8,0) durante a noite à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com a IgG de coelho precipitada, produzida nesse trabalho (1:20.000), por 4 horas à temperatura ambiente. Depois de três lavagens de 5 min com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (1:10.000) (Sigma) por 4 horas à temperatura ambiente protegida da luz. A membrana foi novamente lavada 3 vezes por 5 minutos e a fluorescência do FITC foi observada em um foto documentador de fluorescência FLA 5100 (Fujifilm®).

4.8. ELISA de captura para quantificação da rCap PCV-2

Nesse ELISA, anticorpos anti-rCap PCV-2 produzidos em coelho foram precipitados e utilizados como anticorpos de captura e de detecção, sendo este último conjugado com peroxidase. Microplacas de 96 poços (Nunc Immuno 96 MicroWell™ Plates MaxiSorp™) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de anticorpos de captura diluídos em tampão carbonato 0,05M (pH 9,6) durante a noite a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo Tween 20 (PBST - NaCl 0,9 %; Tween 20 0,05 %; Fosfato 50 mM; pH 7,4), bloqueadas com 100 µL/poço da solução de bloqueio (BSA 3% diluído em PBS) por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas com 100 µL/poço da rCap PCV-2 diluída na solução de diluição (PBS contendo BSA 1%), durante o mesmo período. Após uma nova lavagem, as placas foram incubadas com 100 µL/poço de anticorpos de detecção conjugados com peroxidase, diluídos em solução de diluição e, em seguida, incubados por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e a reação colorimétrica foi desenvolvida utilizando 100 µL/poço da solução contendo o substrato cromogênico [10 mL de tampão citrato fosfato 0,1M; pH 5; 4mg de

O.P.D. (o-Phenylenediamine - C₆H₈N₂, 98%, MW 108,14 – Agros Organics); 5 µL de H₂O₂ 30 %]. A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. A reação de desenvolvimento da cor foi paralisada com 50 µL/poço de solução de H₂SO₄ 1,5 M e a leitura da absorvância realizada em leitora de microplaca *Thermo Plate* (TP-Reader) com DO_{492nm}.

4.8.1. Padronização do teste

Inicialmente a quantidade de 100 µg/mL do anticorpo de captura foi utilizada como sendo a quantidade de saturação dos espaços disponíveis nos poços da placa. Assim, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL/poço de anticorpos de captura diluídos em tampão carbonato em uma concentração fixa de 100 µg/mL, exceto nos poços das colunas 1 e 12. A concentração ótima do antígeno e a diluição ótima do anticorpo de detecção conjugado com peroxidase foram determinadas por procedimentos de titulação padrão *Checkerboard* (Crowther, 1995). A rCap PCV-2 foi incubada na microplaca de 96 poços em 11 diluições seriadas na base 2 (10 µg/mL a 0,0097 µg/mL), sendo adicionada inicialmente em todos os poços da coluna 1, seguindo com a diluição até a coluna 11 com o auxílio de uma pipeta multicanal. Correspondentemente, o anticorpo de detecção (conjugado com peroxidase) foi adicionado a partir da diluição 1:50 até 1:6400, iniciando em todos os poços da linha A e sendo diluído serialmente, na base 2, até a linha H, totalizando 8 diluições. Como controle da técnica, foi adicionado apenas os diluentes nos poços correspondentes a coluna 12. A concentração da rCap PCV-2 que apresentou uma maior interação com todas as diluições testadas do anticorpo de detecção e que pode ser utilizada para detectar e quantificar o anticorpo foi determinada como a concentração ótima da proteína. O valor da DO_{492nm} do anticorpo de detecção conjugado com peroxidase mais próximo de 1,0 foi determinado como a condição ótima de trabalho. Uma vez que a concentração ótima da proteína e do anticorpo de detecção foi determinada, utilizando esse nível de saturação de anticorpos de captura, este foi alterado para analisar o efeito sobre o ensaio. Para essa finalidade, o anticorpo de captura foi imobilizado na microplaca de 96 poços, em 8 diluições seriadas, na base 2, (100 µg/mL a 0,78 µg/mL), sendo adicionado inicialmente nas colunas de 1 a 4 da linha A, seguindo com a diluição até a linha H, em quadruplicata com o auxílio de uma pipeta multicanal. A rCap PCV-2 e o anticorpo de detecção foram adicionados nas quantidades estabelecidas. Baixas

concentrações do anticorpo de captura produziram baixos valores médios de DO_{492nm} , indicando que nem todos os antígenos disponíveis foram capturados, o que determina um limite mínimo de detecção. Portanto, a menor diluição dentre as diluições testadas que produziu um valor de DO_{492nm} próximo a 1, foi determinada como a concentração ótima para capturar antígenos no ensaio.

4.9. Titulação dos anticorpos de captura e de detecção

O título do soro total de coelho, de IgGs precipitadas e de IgGs conjugadas com peroxidase foram verificados por meio de um ELISA indireto quantitativo. Essas amostras foram testadas em duplicatas e utilizando-se 12 diluições seriadas, na base 2 (1:25 a 1:25600), assim como o soro pré-imune que foi utilizado como controle negativo. O inverso da maior diluição na qual a média dos valores de DO_{492nm} de cada amostra estava acima do valor de *cut off* foi considerada como o título da amostra.

4.10. Produção da curva padrão

Após a otimização das condições de trabalho do ELISA de captura, as concentrações da rCap PCV-2 foram utilizadas como referência para a construção de uma curva-padrão utilizando parâmetros de regressão linear. A curva-padrão foi obtida pela diluição seriada, na base 2, da proteína, a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0048 $\mu\text{g/mL}$, sendo cada diluição testada em duplicata, dentro de uma microplaca de 96 poços sensibilizadas com o anticorpo de captura na concentração 0,625 $\mu\text{g/mL}$. A construção da curva padrão foi realizada pelo cálculo da média dos valores das absorbâncias das diferentes diluições da proteína rCap PCV-2. A análise de regressão linear proporciona um índice de correlação entre os dados, o qual deve ser o mais próximo possível de 1,0, o que indica uma boa correlação entre os dois dados analisados.

4.11. Preparo dos extratos de *E.coli*

Como amostra positiva para a quantificação da proteína no extrato vacinal, foram utilizados 0,6g do precipitado, equivalente a 100 mL de meio induzido de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo recombinante pET Cap PCV-2 (Silva Júnior, 2008), contendo o gene correspondente à ORF2 do PCV-2 e induzidas com IPTG (Sigma-Aldrich) para a produção da proteína recombinante. Como amostra negativa, utilizou-se a mesma quantidade do extrato de células transformadas com o vetor pET vazio. Os precipitados dessas células foram descongelados e ressuspensos em 2 mL de tampão de lise (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 5 mM; pH 8,0). Ao tampão de lise foram adicionados lisozima 1 mg/mL (Sigma-Aldrich), PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich) e, em seguida, incubados no gelo por 30 minutos. O processo de lise das células foi realizado com 6 ciclos de sonicação de 10 segundos a 200-300 W cada, com intervalos de 10 segundos e com os tubos no gelo para evitar o aquecimento das amostras. Em seguida, as células lisadas foram congeladas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para evitar degradação das proteínas presentes nos extratos.

4.12. Quantificação da rCap PCV-2 no extrato vacinal de *E.coli*

A concentração desconhecida da rCap PCV-2 presente no extrato vacinal de *E.coli*, foi determinada pela interpolação da média das absorbâncias (em duplicata) frente à curva padrão. A partir da curva padrão que contém a correlação entre as concentrações conhecidas da proteína com os seus respectivos valores de $\text{DO}_{492\text{nm}}$, pode-se calcular a partir da $\text{DO}_{492\text{nm}}$ das amostras analisadas, a quantidade específica da rCap PCV-2 que está presente no extrato vacinal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi padronizada e validada uma metodologia de ELISA para ensaio sorológico e quantificação da rCap PCV-2 em extratos brutos de *E.coli*.

5.1. Expressão e purificação da rCap PCV-2

A expressão da rCap PCV-2 em *E.coli* BL21 foi induzida por 0,25mM de IPTG, sendo a proteína purificada com sucesso utilizando a cromatografia de afinidade em resina de Níquel. O gel SDS-PAGE 15% confirmou a banda de aproximadamente 30 kDa, correspondente à proteína da ORF2 do PCV-2 adicionada da cauda de histidina (Figura 2).

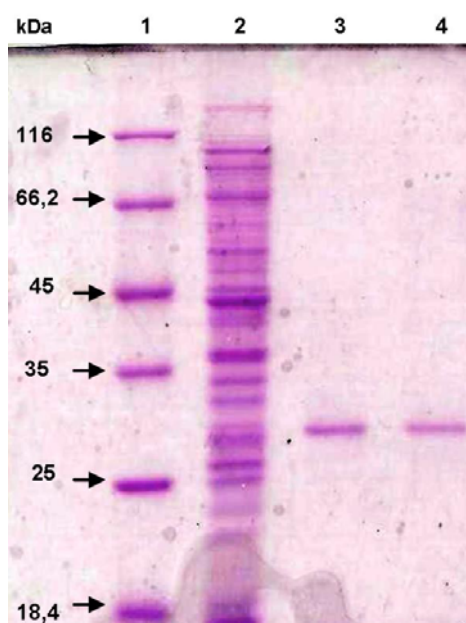


Figura 2: rCap PCV-2 purificada. SDS-PAGE 15 %. 1: Padrão de peso molecular. 2: *E.coli*. BL21 não induzida (C-); 3: rCap PCV-2 (C+); 4: rCap PCV-2 purificada de aproximadamente 30 kDa.

A expressão e pureza da rCap PCV-2 pode ser avaliada como satisfatória através da técnica SDS-PAGE e sua reatividade foi confirmada por *Western blotting*. Após a purificação e confirmação, a proteína foi desalinizada e utilizada na imunização de um coelho para obtenção do soro policlonal anti-rCap PCV-2 e também nos ensaios de ELISA indireto e de captura, uma vez que ela reagiu especificamente tanto com o soro policlonal comercial de suíno anti-PCV-2, como com as IgGs precipitadas a partir do soro policlonal produzido em coelho, utilizados respectivamente nesses ensaios.

5.2. ELISA indireto

5.2.1 - Padronização do ELISA indireto

Para padronização do ELISA indireto foi utilizada a rCap PCV-2 purificada, soro policlonal comercial de suínos anti PCV-2 (*Anti-PCV Antiserum* - VMRD, Inc) e anticorpo secundário (anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma). A diluição ótima do antígeno e do soro avaliados pela titulação *Checkerboard* para o ELISA indireto foi determinada como sendo 0,156 µg/mL e 1:800, respectivamente (Figuras 3 e 4). Essa determinação foi baseada na diluição da rCap PCV-2 que apresentou uma melhor interação com todas as diluições do soro testadas e que pode ser utilizada para detectar e quantificar o anticorpo. Para o soro policlonal positivo, o valor da DO_{492nm} mais próximo de 1,0 foi pontuado como a condição ótima de trabalho (Crowther, 1995). Utilizando esse mesmo padrão, a diluição ótima do conjugado foi definida como 1:51200 (Figura 5).

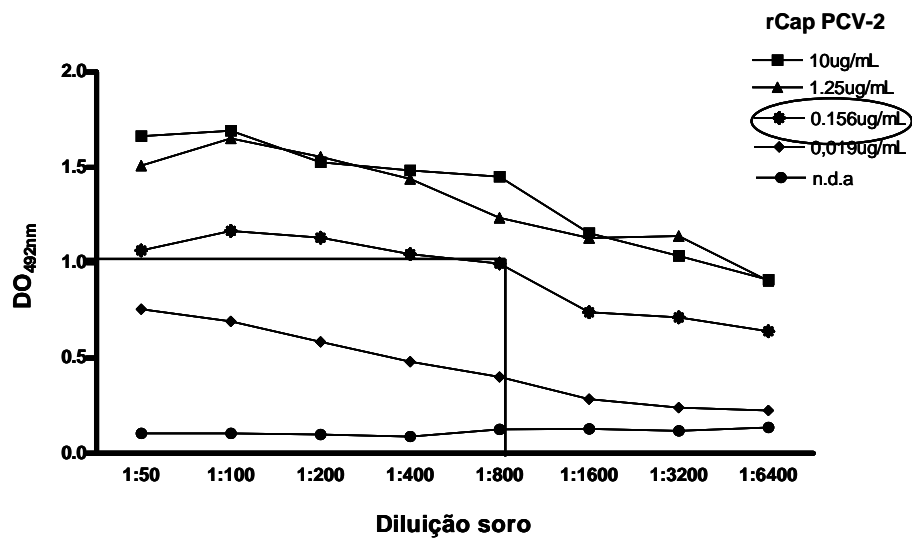


Figura 3: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do soro policlonal e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA indireto: otimização da rCap PCV-2. Diluições de rCap PCV-2 testadas: a partir de 10 µg/mL até 0,0097 µg/mL. Diluições representadas: 10 µg/mL; 1,25 µg/mL; 0,156 µg/mL; 0,019 µg/mL; n.d.a (sem antígeno).

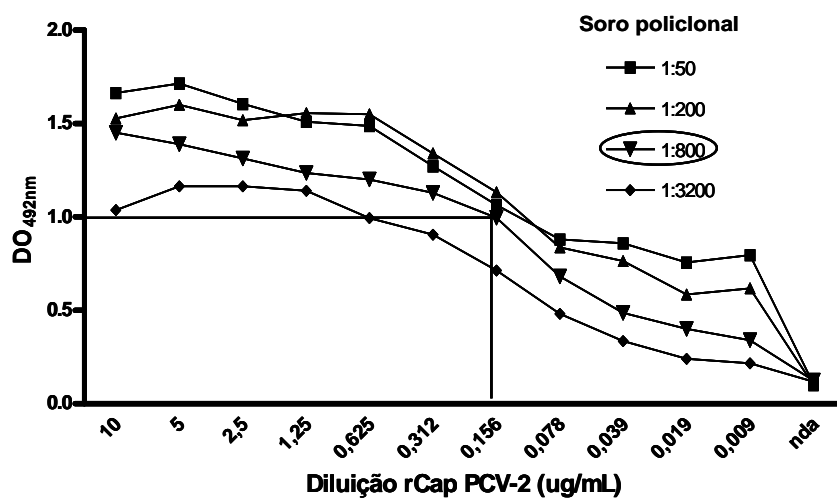


Figura 4: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do soro policlonal e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA indireto: otimização da diluição do soro. Diluições do soro policlonal de suínos testadas: a partir de 1:50 até 1:6400. Diluições representadas: 1:50; 1:200; 1:800; 1:3200; n.d.a (sem antígeno).

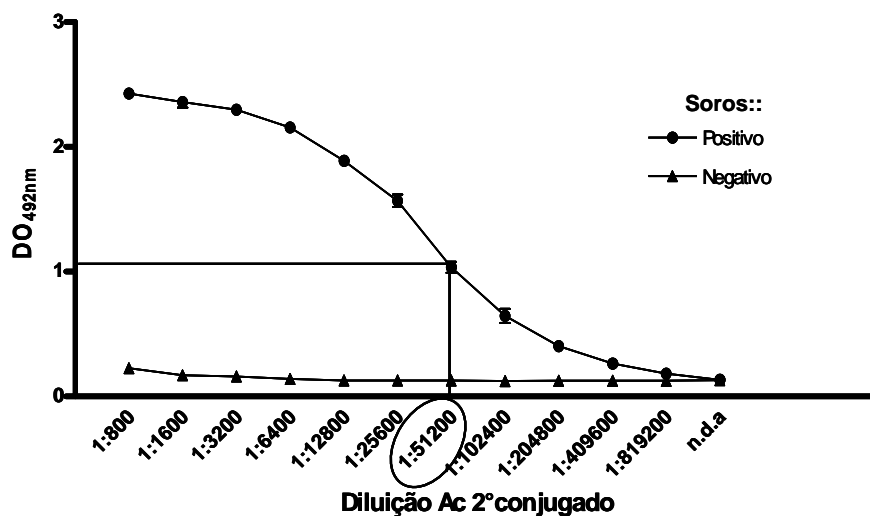


Figura 5: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo secundário: otimização do anticorpo secundário anti-IgG suíno conjugado com peroxidase. Positivo: amostra de soro positivo; Negativa: amostra de soro negativo.

O ELISA indireto tem sido amplamente utilizado no diagnóstico e monitoramento de doenças por meio da detecção de anticorpos (Shuai et al., 2008). O método depende da disponibilidade do antígeno específico na concentração adequada para o revestimento das placas. Quando os antígenos estão em baixa concentração ou na presença de outras proteínas contaminantes, o teste torna-se impossível de ser executado. Assim, o antígeno precisa ser o mais puro possível e não ser alterado com sua adsorção na placa (Crowther, 1995).

O alto grau de pureza da rCap PCV-2 purificada e dialisada utilizada no ELISA reduziu consideravelmente as reações inespecíficas e foi essencial para garantir a qualidade dos ensaios sorológicos desse estudo.

A partir do protocolo obtido com a padronização do ELISA indireto foi possível obter uma boa eficiência da técnica através de um melhor rendimento dos reagentes utilizados no ensaio. A concentração de 0,156 µg/mL da proteína foi definida como a mais adequada, uma vez que ela apresentou melhor interação com todas as diluições do soro testadas, sendo necessário, portanto, menos de 1,5 µg de proteína para sensibilizar uma placa de ELISA de 96

poços, o que viabiliza a utilização dessa técnica para a análise sorológica em larga escala de animais infectados com PCV-2.

O ELISA é utilizado mundialmente para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. Apesar de muitos laboratórios desenvolverem suas próprias metodologias de ELISA, pouco progresso tem sido feito com relação à padronização internacional e validação dessa técnica. Esta falta de acordo é de grande preocupação para organizações, tais como a Organização Internacional de Epizootias (OIE) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), que estão envolvidas no estabelecimento de diretrizes e programas internacionais para o controle, fiscalização e erradicação de doenças infecciosas (Wright et al., 1993).

5.2.2 – Avaliação do ELISA indireto qualitativo

O ELISA indireto foi investigado com relação ao seu uso potencial no diagnóstico sorológico de anticorpos específicos para PCV-2 e sua eficácia foi comparada com o tradicional teste de IPMA.

Amostras de soro de suíno negativas e positivas para o PCV-2 foram examinadas pelo ELISA. A média dos valores de DO_{492nm} e o desvio padrão das 29 amostras negativas por ELISA, foram 0,117 e 0,016, respectivamente, enquanto que os das 125 amostras positivas pela técnica foram 0,539 e 0,269, respectivamente (Figura 6).

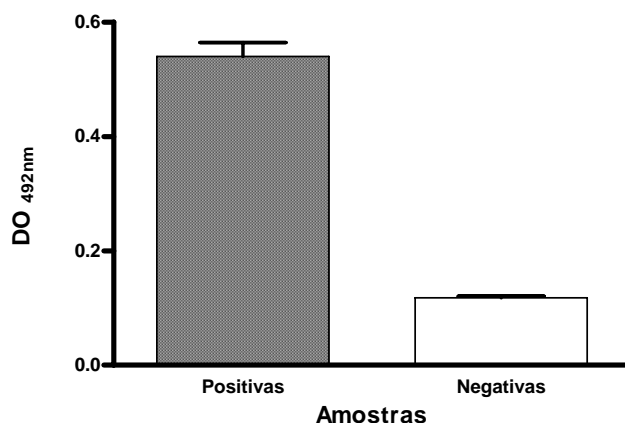


Figura 6: Média das absorvância das amostras positivas e negativas para o ELISA

O *cut off* determinado nesse estudo foi de 0,150 (Tabela 1). Assim, o teste foi considerado positivo quando o valor médio das DO_{492nm} das amostras de soros testadas em duplicata, na diluição ótima, foi detectado acima desse valor.

Tabela 1. Determinação do limiar de positividade: valor de *cut off* de soros negativos para o ELISA

	DO*
Média dos soros negativos	0,117
Desvio padrão	0,016
<i>Cut off</i>	0,150

*Densidade ótica (DO_{492 nm})

Para validação do teste qualitativo, amostras de soro positivas e negativas para PCV-2 foram testadas por ELISA e IPMA e tiveram seus resultados comparados. Das 125 amostras positivas analisadas por IPMA, 124 foram positivas e apenas 1 negativa por ELISA, enquanto que das 30 amostras negativas por IPMA, 29 foram negativas e uma foi positiva para o ELISA (Figura 7).

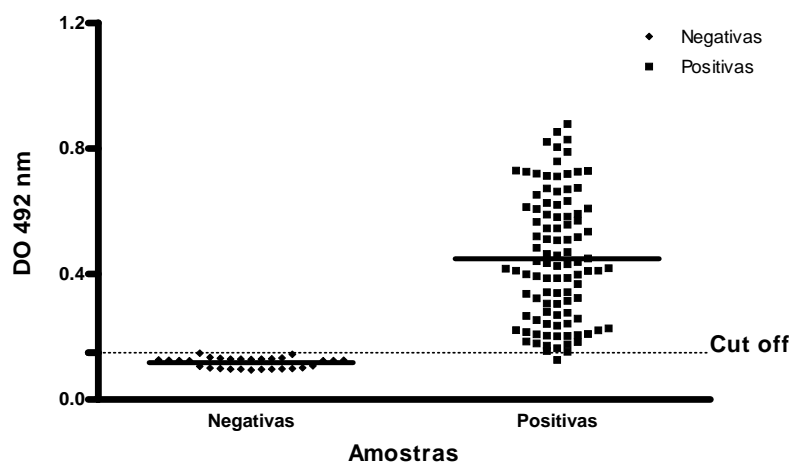


Figura 7: Amostras avaliadas pelo ELISA indireto qualitativo. Negativas: amostras negativas utilizadas no cálculo do *cut off*. Positivas: amostras positivas utilizadas na a validação do teste.

Quando o IPMA foi usado como referência, houve 98,70% de concordância entre os dados obtidos nos dois testes. A sensibilidade e especificidade relativa ao IPMA, os valores preditivos positivos e negativos do ELISA foram determinados como 99,20%, 96,66%, 99,20% e 96,66%, respectivamente. As fórmulas e os resultados de validação do teste encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Validação^a do ELISA para ensaio sorológico de PCV-2. Comparação do ELISA com o IPMA para 155 amostras de soro.

Ensaio	IPMA			
	Reações	Positivas	Negativas	Total
ELISA indireto	Positivas	124(a)	1(b)	125(a+b)
	Negativas	1(c)	29(d)	30(c+d)
	Total	125(a+c)	30(b+d)	155(a+b+c+d)

^aDe acordo com Crowther (2001). Sensibilidade: $(a)/(a+c) \times 100$. Especificidade: $(d)/(b+d) \times 100$. Valor preditivo positivo: $(a)/(a+b) \times 100$. Valor preditivo negativo: $(d)/(c+d) \times 100$. Concordância entre os testes $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$.

Tabela 3. Resultado da validação do ELISA para ensaio sorológico de PCV-2.

Concordância entre os testes:	98,70%
Sensibilidade:	99,2%
Especificidade:	96,66%
Valor preditivo positivo:	99,20%
Valor preditivo negativo:	96,66%

O IPMA é considerado um método sensível para detecção de animais soropositivos para PCV-2 (Allan et al., 1999b). Entretanto, a técnica possui a desvantagem de requerer o cultivo de células o que leva a um maior consumo de tempo, além da necessidade de mão de

obra treinada para a leitura das placas, tornando o teste trabalhoso e demorado, inviabilizando sua utilização para avaliação de amostras em larga escala (Liu et al., 2004). Todavia, a importância da técnica de IPMA está relacionada à obtenção de resultados que auxiliam o entendimento do padrão de infecção dentro do rebanho, sendo possível traçar estratégias de controle para realizar estudos epidemiológicos (Gava, 2006).

As vantagens do ELISA desenvolvido baseado em rCap PCV-2 comparado com o IPMA é a sua simplicidade, sensibilidade e rapidez. Além disso, o resultado é obtido por meio de uma leitora de microplaca, o que facilita sua utilização em larga escala com um menor tempo de execução, além de evitar problemas como interpretações duvidosas, comum em reações com fraca marcação.

Nesse estudo, o ELISA indireto foi avaliado utilizando a rCap PCV-2, como um teste alternativo ao IPMA e apresentou uma boa concordância (98,70%) com o mesmo. Ensaios de ELISA realizados por Liu et al, (2004) e Shang et al, (2008), utilizando a rCap PCV-2 expressa em baculovírus e *E.coli*, respectivamente, também apresentaram boa concordância com o IPMA.

Segundo Shuai et al (2008), diferenças significativas na prevalência da infecção pelo PCV-2 dentro do rebanho, pode ser devido a diferenças no status de saúde, nas estratégias de vacinação ou nas medidas de manejo. Avaliando o perfil sorológico característico de suíno a campo, o título de anticorpos começa a aumentar significativamente na 8ª semana de vida, atingindo o pico na 16ª semana e após esse período, ele começa a cair atingindo um valor médio estável na 25ª semana, que persiste durante a vida adulta (Carasova et al., 2007). Entretanto, estudos transversais realizados em granjas brasileiras mostraram uma soroconversão tardia, aos 120 dias de vida, com pequeno aumento do título de anticorpos totais, indicando uma baixa circulação viral, com fraco estímulo para soroconversão e um atraso na resposta humoral específica para o PCV-2 (Gerber, 2010). Assim, baixos níveis de anticorpos circulantes necessitam de testes mais sensíveis para serem identificados.

Dados da literatura demonstraram que o ELISA utilizando a rCap PCV-2 purificada como antígeno de cobertura apresenta melhor resultado do que a utilização da partícula viral obtida a partir do cultivo de células para a sensibilização da placa (Nawagitgul et al., 2002). A

proteína purificada melhora a sensibilidade e especificidade do teste, assim, variações entre os resultados dos testes (ELISA x IPMA) podem ser justificadas tanto pela diferença da sensibilidade dos antígenos utilizados nessas técnicas, como pode ser também uma indicativa de flutuação da resposta imune contra as diferentes proteínas codificadas pelos genes do PCV-2 durante o progresso de infecção e doença (Perez-Martin et al., 2008).

A concordância entre os testes analisado, valida o ELISA desenvolvido, que ofereceu como vantagem, uma alta sensibilidade, facilidade de padronização e operacionalidade. Um dos fatores de maior relevância para o diagnóstico da Circovirose suína é a sua precocidade e, nesse estudo, a sensibilidade foi importante para a análise sorológica e fundamental para detectar a infecção na fase inicial, quando baixos níveis de anticorpos estão presentes, possibilitando assim, um melhor monitoramento dos plantéis infectados.

5.2.3 – Avaliação do ELISA indireto quantitativo

Para a análise quantitativa do ELISA indireto, 20 amostras de soro positivas para ambos os testes, previamente tituladas por IPMA, foram também tituladas por ELISA. Dessas 20 amostras, 18 apresentaram título maior do que o título determinado por IPMA. Uma amostra apresentou o título igual em ambos os testes e apenas uma das amostras apresentou o título determinado por ELISA menor do que o título determinado por IPMA (Figura 8). O limite de detecção ELISA/IPMA calculado mostrou quantas vezes o teste foi mais sensível em detectar o título do anticorpo (Tabela 3).

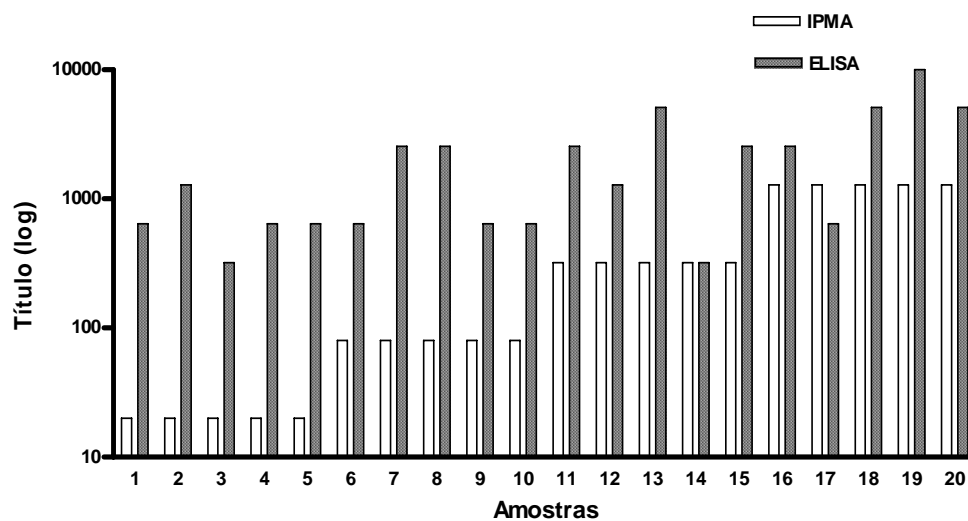


Figura 8: ELISA quantitativo: título de 20 amostras de soro detectado por IPMA e ELISA

Tabela 3. Título e Limiar de detecção ELISA/IPMA de 20 amostras de soro

<i>Amostras</i>	<i>Soro</i>	<i>Título IPMA</i>	<i>Título ELISA</i>	<i>Limiar de detecção ELISA/IPMA</i>
1	14	20	640	32
2	41	20	1280	64
3	48	20	320	16
4	49	20	640	32
5	61	20	640	32
6	10	80	640	8
7	13	80	2560	32
8	35	80	2560	32
9	60	80	640	8
10	78	80	640	8
11	6	320	2560	8
12	15	320	1280	4
13	36	320	5120	16
14	62	320	320	1
15	76	320	2560	8
16	1	1280	2560	2
17	19	1280	640	Menor
18	30	1280	5120	2
19	74	1280	10240	8
20	97	1280	5120	4

O teste de ELISA mostrou-se novamente mais sensível na determinação do título de anticorpos, apresentando um maior limite de detecção quando comparado com o título estabelecido pelo IPMA. Além disso, a especificidade da rCap PCV-2 mostrou-se favorável ao ensaio uma vez que a mesma não reagiu com o soro negativo.

A maior sensibilidade do teste de ELISA pode ser explicada em parte pelo mecanismo de interação antígeno-anticorpo. Enquanto o ELISA requer somente a ligação de um simples epítipo para obter um resultado positivo, tendo como antígeno único a Cap, o IPMA tem como antígeno a partícula viral, onde pequenas alterações antigênicas, devido ao crescimento e a passagem do vírus na célula, podem influenciar a sensibilidade do teste, além de requerer a expressão de proteínas na membrana celular. Além disso, no IPMA, variações na quantidade de partículas virais que entram na célula, pode influenciar na titulação dos anticorpos pela técnica (Gava, 2006).

Outro fato que explica essa diferença pode ser devido à flutuação da resposta imune contra as proteínas codificadas pelos genes *rep* e *cap* durante a evolução da doença (Perez-Martin et al., 2008). Este efeito juntamente com a necessidade de grandes quantidades de partículas virais e anticorpo assim como a realização de leitura visual subjetiva que não permite medir a real intensidade da reação, são possíveis causas da limitação da técnica de IPMA (Ellis et al., 1998).

O ELISA baseado na rCap PCV-2 desenvolvido nesse estudo foi específico e sensível na detecção de anticorpos anti-PCV-2 apresentando um potencial para o seu uso no monitoramento da soroprevalência do PCV-2 em larga escala, sendo também útil como ferramenta para o controle das PCVAD no campo. Adicionalmente, este teste fornece uma ferramenta simples, segura e rápida para ser utilizado em uma ampla avaliação sorológica e epidemiológica após a implantação de programas de vacinação.

5.3. Precipitação e confirmação das IgG anti-rCap PCV-2

A precipitação das IgGs do soro policlonal anti-rCap PCV-2 produzido em coelho foi avaliada em gel SDS-PAGE 10%. As IgGs precipitadas e reduzidas, devido a presença do β -

mercaptoetanol no tampão de amostra, foram confirmadas com a presença das proteínas referentes à cadeia leve (25 kDa) e à cadeia pesada (50 kDa) das IgGs (Figura 9).

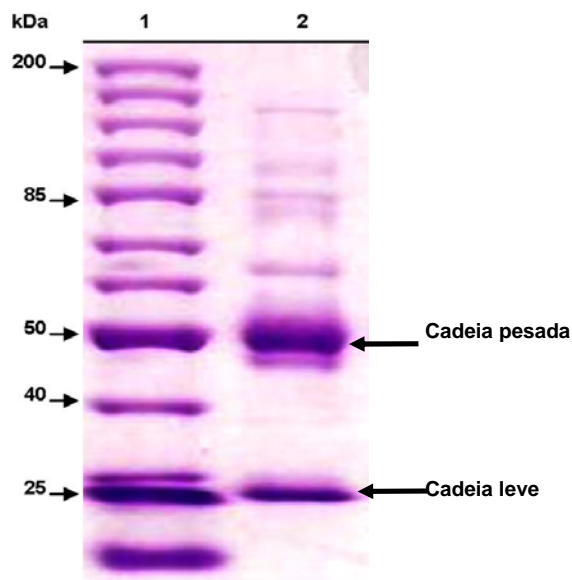


Figura 9: Confirmação da precipitação das IgGs do soro de coelho policlonal anti-rCap PCV-2: 1: padrão de peso molecular; 2: IgGs precipitadas e reduzidas pelo tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol.

Shuai et al (2008) avaliaram as características de anticorpos policlonais anti-Cap PCV-2, que confirmam ser específicos para PCV-2 através da Imunofluorescência indireta. Neste teste apenas proteínas do PCV-2 foram detectadas em células infectadas e nenhum sinal foi observado em células PK-15 livres e contaminadas com PCV-1, indicando que anticorpos policlonais anti-Cap PCV-2 foram eficientes e específicos para o ensaio, com o custo muito menor do que a utilização de anticorpos monoclonais (Shuai et al., 2008).

5.4. Avaliação da especificidade das IgGs precipitadas anti-rCap PCV-2

Para confirmar a especificidade das IgG precipitadas, utilizadas no ELISA de captura, foi efetuado um ensaio de *Western blotting* utilizando a rCap PCV-2, extrato de *E.coli* positivo e negativo. A análise do resultado do *Western blotting* confirmou uma banda de aproximadamente 30 kDa, correspondente à proteína rCap PCV-2 havendo, portanto,

reconhecimento tanto da proteína purificada, como no extrato positivo (Figura 16). Nenhuma marcação foi encontrada na amostra negativa. Com isso, pode-se confirmar que as IgGs precipitadas anti-rCap PCV-2 são específicas para o reconhecimento dessa proteína.

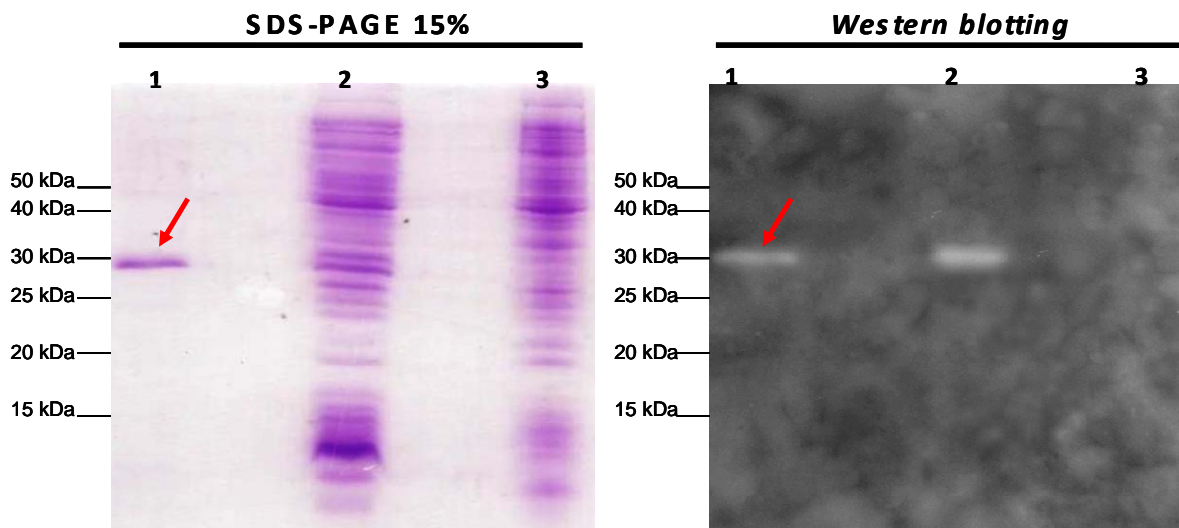


Figura 10: Western blotting do extrato de *E.coli* para verificação de rCap PCV-2: 1: Proteína rCap PCV-2 purificada. 2: extrato de *E.coli* positivo. 3: extrato de *E.coli* negativo.

5.5. Titulação dos anticorpos de captura e de detecção.

O título do soro total de coelho anti-rCap PCV-2, dos anticorpos de captura (IgGs precipitadas) e dos anticorpos de detecção (IgGs conjugadas com peroxidase) foram verificados por meio de um ELISA indireto quantitativo. Eles apresentaram o título 25600, 25600 e 800, respectivamente (Figura 10).

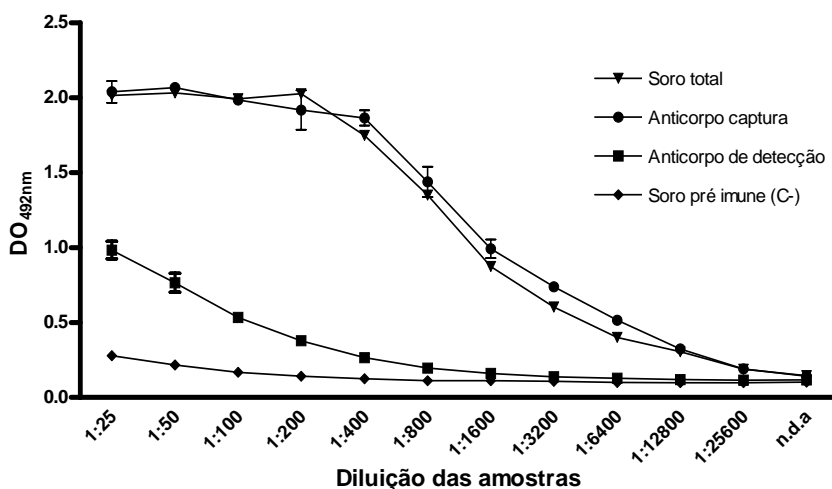


Figura 11: Titulação do soro total de coelho anti-rCap PCV-2, dos anticorpos de captura e de detecção. Soro total de coelho anti-rCap PCV-2; título 25600. Anticorpos de captura; título 25600. Anticorpos de detecção; título 1600. Soro pré-imune (controle negativo).

Os fragmentos Fabs dos anticorpos são acoplados covalentemente com peroxidase produzindo conjugados estáveis, antígeno-dirigido e capazes de produzir uma coloração específica (Wilson and Nakane, 1978).

5.6. ELISA de captura

5.6.1. Padronização do teste

Para padronização do ELISA de captura foi utilizada a rCap PCV-2 purificada, anticorpos de captura (IgGs anti-rCap PCV-2 precipitadas) e anticorpo de detecção (IgGs anti-rCap PCV-2 conjugada com peroxidase). A concentração ótima da proteína e diluição a ótima do anticorpo de detecção avaliados pela titulação *Checkerboard* para o ELISA de captura (Figura 11) foram determinados como sendo 0,625 µg/mL e 1:200, respectivamente (Figura 12 e 13). Essa determinação foi baseada na diluição da rCap PCV-2 que apresentou uma melhor interação com todas as diluições testadas do anticorpo de detecção e que pode ser utilizada para detectar e quantificar o anticorpo. Para o anticorpo de detecção, o valor da DO_{492nm} do anticorpo mais próximo de 1,0 foi pontuado como a condição ótima de trabalho (Crowther,

1995). Utilizando esse mesmo padrão, após a definição da concentração da proteína e do anticorpo de detecção, a concentração ótima do anticorpo de captura foi definida como 15 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

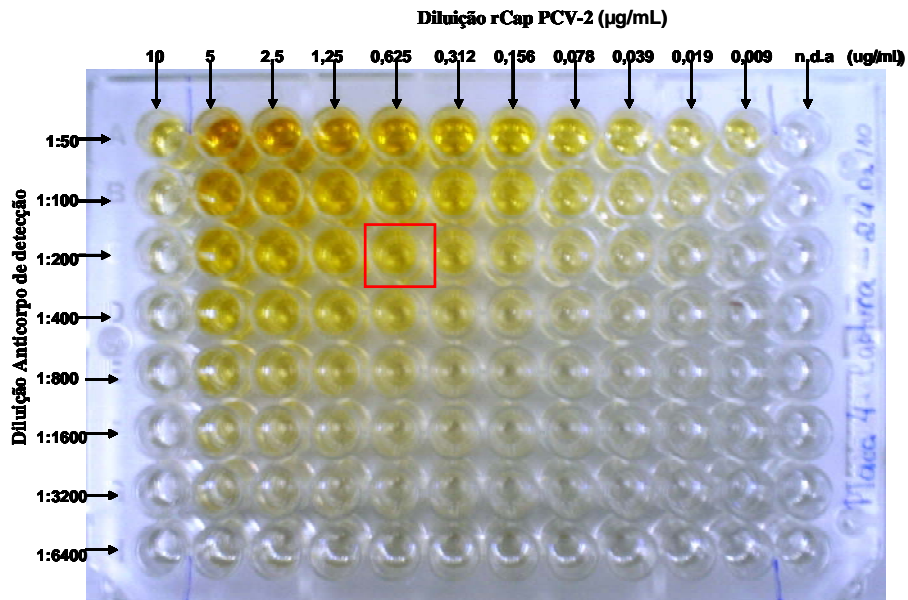


Figura 12: Titulação *Checkerboard* para o ELISA de captura: rCap PCV-2 x Anticorpo de detecção

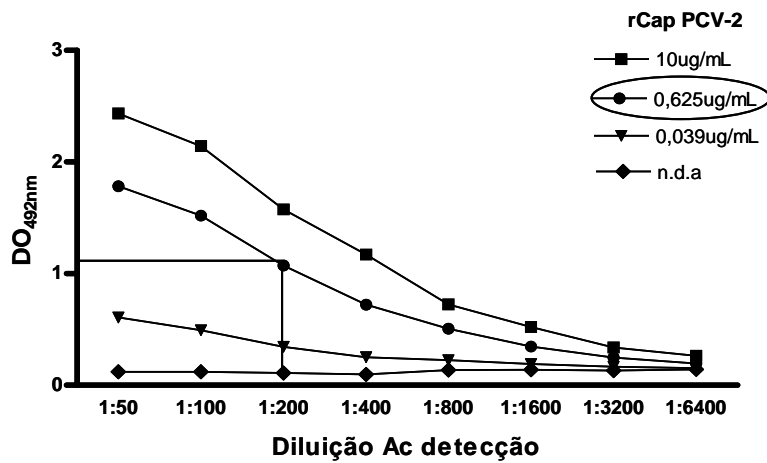


Figura 13: Valores de $\text{DO}_{492\text{nm}}$ nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização da rCap PCV-2. Diluições de rCap PCV-2 testadas: a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ até 0,0097 $\mu\text{g/mL}$. Diluições representadas: 10 $\mu\text{g/mL}$; 0,625 $\mu\text{g/mL}$; 0,039 $\mu\text{g/mL}$; n.d.a (sem antígeno).

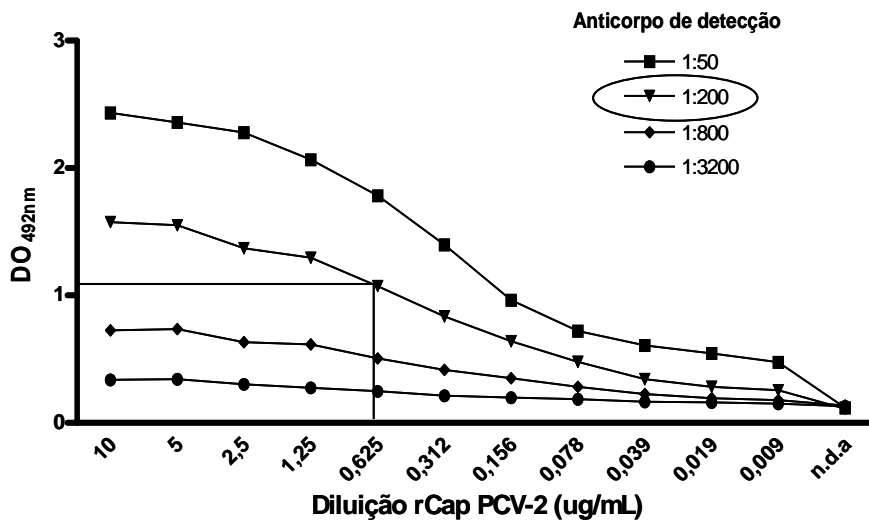


Figura 14: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização do anticorpo de detecção: Diluições do anticorpo de detecção testadas: a partir de 1:50 até 1:6400. Diluições representadas: 1:50; 1:200; 1:800; 1:3200; n.d.a (apenas soluções).

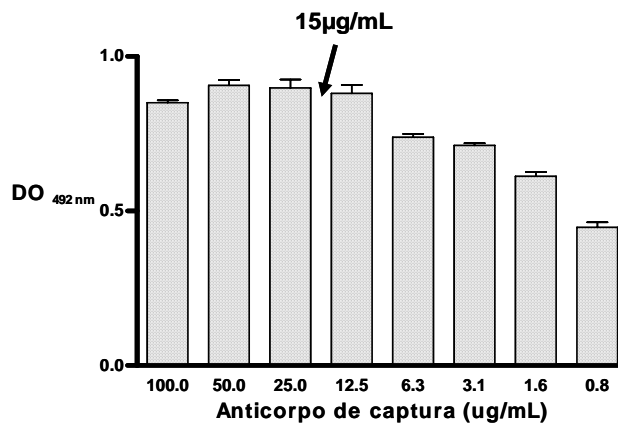


Figura 15: Valores de DO_{492nm} nas diferentes diluições do anticorpo de detecção e da rCap PCV-2 obtidos na padronização do ELISA de captura: otimização do anticorpo de captura. Diluições do anticorpo de captura testadas: 100 µg/mL a 0,8 µg/mL.

A utilização do ELISA de captura é indicada quando o antígeno se fixa fracamente na placa, está em baixa concentração ou há contaminação com outras proteínas, como por exemplo, amostras de fezes, ou ainda, quando sua purificação é inviável por ele ser antigenicamente instável se separado de outros componentes. Assim, este ensaio supera todos esses problemas uma vez que o antígeno é fixado através de anticorpos específicos, favorecendo sua apresentação de uma maneira melhor do que quando eles estão diretamente cobrindo a placa, limitando assim, as mudanças conformacionais de epítomos devido ao contato direto com superfície (Crowther, 1995).

O ELISA de captura oferece vantagem sobre o ELISA indireto na quantificação de antígenos, uma vez que a fixação direta desses na placa é, muitas vezes, não linear e desproporcional à quantidade de proteína presente na amostra. Isso ainda é agravado se proteínas contaminantes estiverem presentes, uma vez que elas competem com locais na placa de maneira não linear. Como o anticorpo de captura é específico, a ligação com o antígeno torna-se proporcional à concentração das proteínas presentes. Dessa maneira, os ensaios dão maior reprodutibilidade nos resultados, onde a quantificação é requerida (Crowther, 2001).

5.6.2. Produção da curva padrão

A rCap PCV-2 foi utilizada para a produção de uma curva padrão com concentrações a partir de 5 a 0,0048 $\mu\text{g/mL}$ e as correspondentes $\text{DO}_{492\text{nm}}$, calculadas pela média dos valores das absorbâncias das diferentes diluições da proteína, testadas em duplicatas. A faixa de trabalho do ensaio foi definida como a região linear da curva com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9906$, o que indica que existe uma correlação linear entre a $\text{DO}_{492\text{nm}}$ e as concentrações de rCap PCV-2. Assim, os sete pontos de calibração foram de 0,625 a 0,0097 $\mu\text{g/mL}$ de rCap PCV-2. Na curva padrão representada (Figura 15), a linha pontilhada foi obtida a partir dos valores de $\text{DO}_{492\text{nm}}$ das concentrações de rCap PCV-2 e a linha contínua corresponde ao resultado da análise de regressão linear que mostra uma correlação linear entre os dois dados.

Concentração (µg/mL)	DO _{492nm}
0,625	0,7185
0,3125	0,4825
0,15625	0,348
0,078125	0,2645
0,039063	0,214
0,019531	0,1955
0,009766	0,169

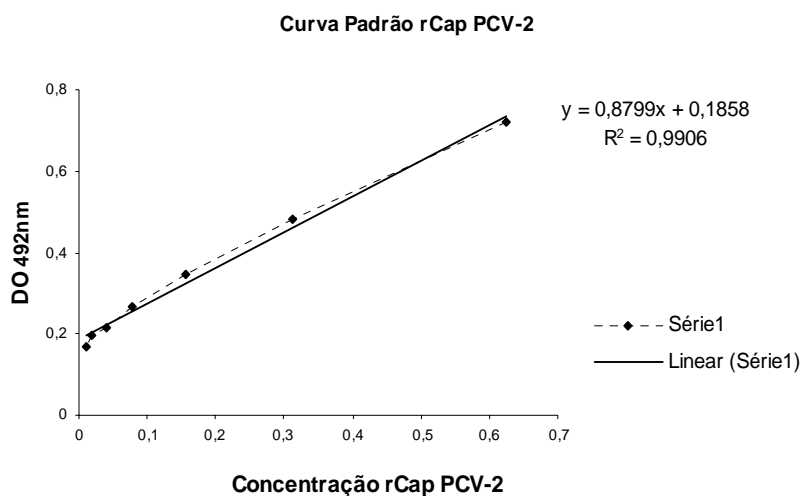


Figura 16: Curva padrão da rCap PCV-2 para estimativa da concentração protéica.

5.7. Quantificação da rCap PCV-2 no extrato vacinal

Segundo Holden et al. (2005), para a determinação da concentração da proteína no extrato de *E.coli*, diluições seriadas do extrato devem ser realizadas e a diluição na qual o valor de DO_{492nm} é mais próximo do ponto médio da parte linear da curva padrão, deve ser utilizada para calcular a concentração da proteína no extrato.

Como exemplo de aplicação da quantificação da rCap PCV-2, utilizando a diluição de 1:25600 do extrato positivo, cujo valor de DO_{492nm} é 0,251 e é próximo ao valor do ponto médio da curva linear (0,078 µg/mL), ao substituir esse valor em y (valor da DO_{492nm}) na equação da reta, é possível calcular o valor de x que corresponde a quantidade de proteína presente nessa diluição, ou seja, 0,075 µg/mL.

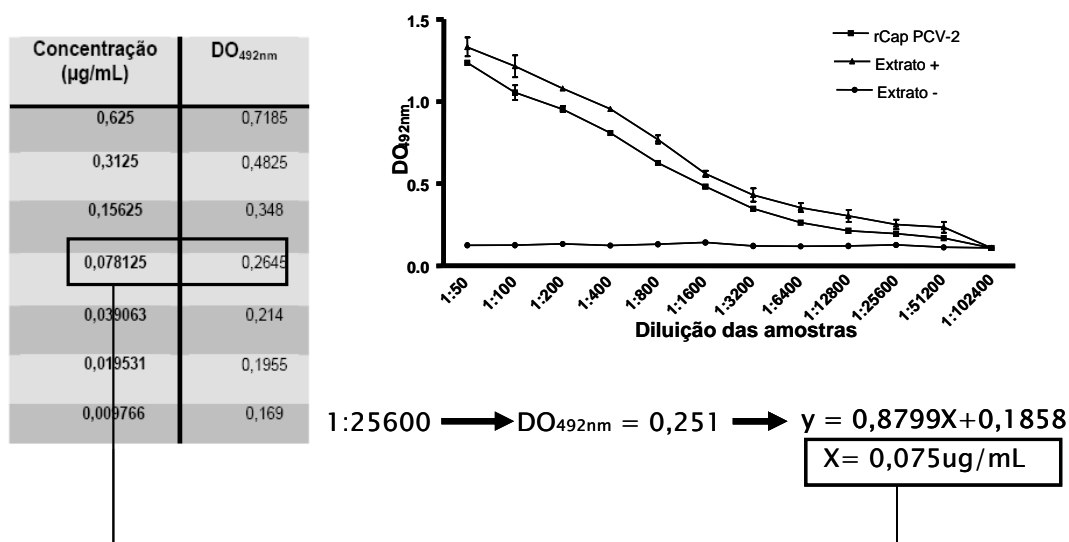


Figura 17: Determinação da concentração protéica de rCap PCV-2 presente em extrato de *E.coli*. Diluições das amostras: rCap PCV-2: diluições 10µg/mL a 0,004883 µg/mL. Extrato de *E.coli* positivo: diluições 1:50 a 1:103200. Extrato de *E.coli* negativo: diluições 1:50 a 1:103200

Esse valor também pode ser determinado diretamente pela observação do gráfico através da interpolação do valor de DO_{492nm} referente a cada diluição do extrato, frente à curva padrão.

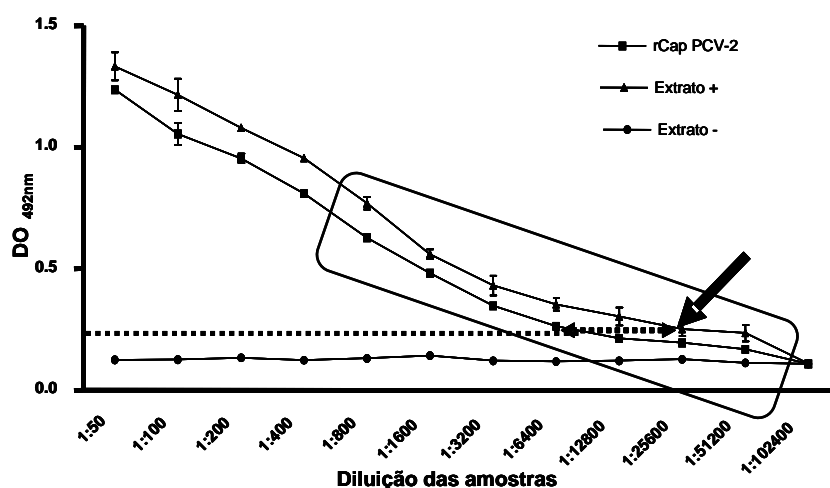


Figura 18: Determinação da concentração protéica de rCap PCV-2 presente em extrato de *E.coli*, através do gráfico.

As respostas para o extrato positivo foram lineares, com exatidão dentro dos níveis de aceitabilidade. A faixa de linearidade foi obtida a partir da diluição 1:800 do extrato. Nas Figuras 17 e 18, estão apresentados graficamente os efeitos das diferentes diluições do extrato na linearidade das respostas segundo os teores de adição. As variações de absorvância das diluições, localizadas dentro da faixa de linearidade determinada, foram diretamente proporcionais a concentração de rCap PCV-2 na faixa entre 0,625 a 0,0097 µg/mL, consideradas como sendo os limites superior e inferior de detecção da proteína, respectivamente. A amostra negativa apresentou teor inferior ao limite de quantificação, mesmo quando adicionado em baixas diluições, não existindo, portanto, reações cruzadas com os diferentes tipos de proteínas presentes no extrato, o que não influencia a qualidade dos valores estabelecidos.

A quantidade da proteína detectada pode ser estimada através da equação: $Y=0,8799x+0,1858$ ($R^2=0,9906$), onde o valor de Y corresponde ao valor de DO_{492nm} , e o valor de X determina a concentração da proteína, conforme representado na Tabela 5. Entretanto, uma maior variabilidade dos resultados nas repetições dos ensaios de ELISA é esperada, sendo, portanto necessário a construção da curva de calibração a cada nova medida. A quantidade de proteína depende do processo de indução, assim como da transformação e preparação das células competentes.

Portanto, o ELISA de captura foi capaz de detectar e quantificar a rCap PCV-2 em extratos vacinais de *E.coli* e demonstrou ser um método preciso podendo ser utilizado em análises de rotina. Assim espera-se que este teste seja também aplicado na quantificação do PCV-2 em amostras de campo.

Tabela 5: Quantificações da rCap PCV-2 nas diferentes diluições do extrato de *E.coli*

Diluição do extrato de <i>E.coli</i>	Média dos valores de DO_{492nm}	Concentração rCap PCV-2
1:50	1,333	1,303 µg/mL
1:100	1,216	1,170 µg/mL
1:200	1,081	1,017 µg/mL
1:400	0,955	0,874 µg/mL
1:800	0,770	0,663 µg/mL
1:1600	0,560	0,425 µg/mL
1:3200	0,431	0,278 µg/mL
1:6400	0,354	0,191 µg/mL
1:12800	0,304	0,134 µg/mL
1:25600	0,251	0,074 µg/mL
1:51200	0,236	0,057 µg/mL

6. CONCLUSÕES

- 1- O ELISA indireto qualitativo baseado na rCap PCV-2 desenvolvido e padronizado nesse estudo, apresentou uma alta sensibilidade, sendo possível detectar anticorpos contra PCV-2 em amostras de soro.
- 2- O ELISA indireto quantitativo apresentou uma maior capacidade de detecção de anticorpos contra PCV-2 do que o IPMA, mostrando-se com isso, eficiente na determinação do título desses anticorpos. Trata-se, portanto, de uma ferramenta simples, segura e rápida para ser utilizado em uma ampla avaliação sorológica e epidemiológica após a implantação de programas de vacinação.
- 3- O ELISA de captura foi capaz de detectar e quantificar a rCap PCV-2. O teste demonstrou uma boa precisão, sendo considerado um método seguro e que pode ser utilizado com sucesso para quantificação dessa proteína em extratos vacinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albina, E., Truong, C., Hutet, E., Blanchard, P., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., Mahe, D., Allee, C., Morvan, H., Amenna, N., Le Dimna, M., Madec, F., Jestin, A., 2001, An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol* 125, 292-303.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999a, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121, 1-11.
- Allan, G.M., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C.E., 1999b, Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66, 115-123.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A., Adair, B., Ellis, W.A., McNulty, M.S., 1995, Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 44, 49-64.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, 3-10.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., 2000, Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet Rec* 147, 170-171.
- Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., McNulty, M.S., 1994, Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B* 41, 17-26.
- Barcellos, D.A., Pescador, C.E., 2003, Circovirose suína. *Sanidade em Foco* 6, 3.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A., 2003a, Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21, 4565-4575.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Truong, C., Le Dimna, M., Arnauld, C., Rose, N., Eveno, E., Albina, E., Madec, F., Jestin, A., 2003b, An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 94, 183-194.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Calsamiglia, M., Segales, J., Quintana, J., Rosell, C., Domingo, M., 2002, Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 40, 1848-1850.
- Carasova, P., Celer, V., Takacova, K., Trundova, M., Molinkova, D., Lobova, D., Smola, J., 2007, The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci* 83, 274-278.
- Castro, A.M., Ruiz, V.L., Castro Jr, F.G., Bersano, J.G., Moreno, A.M., Cortez, A., Villalobos, E.M.C., Leomil, H., Richtzenhain, L.J. 2003. Detecção e diferenciação do circovirus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. In In: XI Congresso Brasileiro de

- Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES (Goiás, Anais.....Goiás: ABRAVES, 2003), pp. 107-108.
- Chae, C., 2004, Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168, 41-49.
- Cheung, A.K., 2004, Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. *J Virol* 78, 9016-9029.
- Chiarelli-Neto, O., Silva, J.R.A., Castro, L.A., Winter, V., Silva, F.M.F., Bonfá, G., Moraes, M.P., Almeida, M.R. 2006. Detecção do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em animais de abate no centro norte do estado do espírito santo. In *Scientia. Rev. Cent. Univ. Vila Velha, Vila Velha (ES)*, , p. 33.
- Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S., Vidigal, P.M., Silva, F.M., Castro, L.A., Fietto, J.L., Silva, A., Jr., Almeida, M.R., 2009, Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Res* 140, 57-63.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Simon, N.L., Pinto, L.S., Viancelli, A., Fernandes, L.T., Hayashi, M., Dellagostin, O.A., Esteves, P.A., 2009, Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Res Vet Sci* 87, 157-160.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Morés, N., Schiochet, M.F., Trombetta, C. 2001. Diagnóstico molecular e caracterização do circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In *In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES (Anais..Porto Alegre: ABRAVES, 2001)*, pp. 97-98.
- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, C. 2009. Aprovações Comerciais: Vacinas. (Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12483.html>>.).
- Crowther, J.R., 1995, ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol* 42, 1-223.
- Crowther, J.R., 2001, *The ELISA Guidebook*, 1st ed. Edition. Humana Press, New Jersey, USA, 421 p.
- Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003, Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol* 77, 13036-13041.
- Davies, D.R., Padlan, E.A., Sheriff, S., 1990, Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 59, 439-473.
- Dragunsky, E.M., Ivanov, A.P., Wells, V.R., Ivshina, A.V., Rezapkin, G.V., Abe, S., Potapova, S.G., Enterline, J.C., Hashizume, S., Chumakov, K.M., 2004, Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccines: a new surrogate method for predicting vaccine efficacy. *J Infect Dis* 190, 1404-1412.
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008, Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128, 56-64.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998, Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal* 39, 44-51.
- Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., McNeilly, F., 1999, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest* 11, 3-14.

- Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.J., 2000, Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38, 2494-2503.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Royer, R., Thomas, P., Nawagitgul, P., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002, Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76, 541-551.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004a, A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol* 78, 6297-6303.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004b, Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol* 78, 13440-13446.
- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007, Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* 125, 244-255.
- Fort, M., Sibila, M., Perez-Martin, E., Nofrarias, M., Mateu, E., Segales, J., 2009, One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031-4037.
- Fournier-Caruana, J., Poirier, B., Haond, G., Jallet, C., Fuchs, F., Tordo, N., Perrin, P., 2003, Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. *Biologicals* 31, 9-16.
- França, T.N., Ribeiro, C.T., Cunha, B.M., Peixoto, P.V., 2005, Porcine Circovirose: a review. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25, 59-72.
- Gava, D., 2006. Padronização de técnicas de diagnóstico para circovírus suíno tipo 2e e estudo do papel do macho na epidemiologia da doença. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages-SC.
- Gerber, P.F., 2010. Estudo da transferência passiva de imunoglobulinas e infecção precoce de leitões por circovírus suíno 2 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Gerber, P.F., Galinari, G.C., Silva, M.X., Campos, F.S., Reis, A.C., Lobato, Z.I., 2009, Distribution of antibodies against porcine circovirus type-2 (PCV2) in single site and multi-site farrow-to-finish farms in Brazil. *Res Vet Sci* 87, 488-491.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008, A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 128, 23-35.
- Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., Banks, M., 2004, Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol* 149, 1171-1183.
- Grierson, S.S., King, D.P., Tucker, A.W., Donadeu, M., Mellencamp, M.A., Haverson, K., Banks, M., Bailey, M., 2007, Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pig: correlation with

- the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 254-268.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998, Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72, 5262-5267.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001, Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38, 528-539.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008, Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* 132, 201-207.
- Holden, L., Faeste, C.K., Egaas, E., 2005, Quantitative sandwich ELISA for the determination of lupine (*Lupinus* spp.) in foods. *J Agric Food Chem* 53, 5866-5871.
- Juhan, N.M., LeRoith, T., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2010, The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. *Virus Res* 147, 60-66.
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Botner, A., 2004, Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358-1361.
- Karuppanan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J., 2009, Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* 383, 338-347.
- Kennedy, S., Segales, J., Rovira, A., Scholes, S., Domingo, M., Moffett, D., Meehan, B., O'Neill, R., McNeilly, F., Allan, G., 2003, Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 15, 151-156.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G., 2005, Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J Vet Diagn Invest* 17, 213-222.
- Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G., Ellis, J.A., 2008, Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 69, 1615-1622.
- Kristensen, C.S., Baekbo, P., Bille-Hansen, V., Botner, A., Vigre, H., Enoe, C., Larsen, L.E., 2009, Induction of porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs from PMWS unaffected herds following mingling with pigs from PMWS-affected herds. *Vet Microbiol* 138, 244-250.
- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R., 1999, Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80, 69-75.
- Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2002, Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 90, 101-112.
- Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2003, Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67, 114-120.

- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyiom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J., 2004, Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol* 78, 8135-8145.
- Liu, C., Ihara, T., Nunoya, T., Ueda, S., 2004, Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *J Vet Med Sci* 66, 237-242.
- Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppanan, A.K., Kwang, J., 2007, The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J Virol* 81, 9560-9567.
- Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., 2001, Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285, 91-99.
- Lukert, P.D., de Boer, G.F., Dale, J.L., Keese, P., McNulty, M.S., Randles, J.W., Tischer, I. 1995. *The Circoviridae, Viruses, I.V.T.S.R.o.t.I.C.o.T.o.*, ed.
- Madec, F., Rose, N., Grasland, B., Cariolet, R., Jestin, A., 2008, Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transbound Emerg Dis* 55, 273-283.
- Madruga, C.R., Marques, A.P.C., Araújo, F.R., Migueta, M., Carvalho, C.M.E., Araújo, F.S., Umaki, A.C.S., Crocci, A.J., Queiróz, R.A., 2001, Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 21, 72-76.
- Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000, Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81, 1815-1824.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Hermans, F.J., 1965, Immunochemical quantitation of antigens by a single radial immunodiffusion. *Immunochemical* 2, p.235-254.
- Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., 2004, Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98, 81-88.
- Mankertz, A., Mankertz, J., Wolf, K., Buhk, H.J., 1998, Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 79 (Pt 2), 381-384.
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., Buhk, H.J., 1997, Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 71, 2562-2566.
- McIntosh, K.A., Harding, J.C., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006a, Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Can J Vet Res* 70, 58-61.
- McIntosh, K.A., Harding, J.C., Parker, S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006b, Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J Vet Diagn Invest* 18, 380-384.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J.A., Krakowka, S., Allan, G.M., 2001, Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol* 146, 835-842.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2171-2179.

- Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Earle, J.A., Hoey, E.M., McNulty, M.S., 1992, Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch Virol* 124, 301-319.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006, Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res* 2, 6.
- Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H.J., 2005, Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18, 333-341.
- Monnerat, F.S., Moraes, M.P., Oliveira, F.S., Silva Júnior, A., Almeida, S.R., Almeida, M.R., Santos, J.L., 2003, Porcine circovirus infection in animals in the state of Minas Gerais . In: XIV Encontro Nacional de Virologia, Florianópolis, SC. *Journal of the Brazilian Society For Virology*, v. 08. p. 77-77.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998, Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36, 2535-2541.
- Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C., Paul, P.S., 2002, Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 33-40.
- Nunes, G. 2005. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. In *Química Nova*, pp. 462-471.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175-185.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Zhou, E.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006, Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J Gen Virol* 87, 2923-2932.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002, Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76, 4241-4250.
- Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., Chae, C., 2005, Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 132, 139-144.
- Pejsak, Z., Podgorska, K., Truszczynski, M., Karbowski, P., Stadejek, T., 2009, Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.
- Perez-Filgueira, D.M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M.G., Barcena, J., Escribano, J.M., 2007, Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-430.

- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilaguuet, J.M., Nofrarias, M., Escribano, J.M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., Rodriguez, F., 2008, Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* 154, 167-174.
- Perez-Martin, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodriguez, F., Segales, J., 2007, A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J Virol Methods* 146, 86-95.
- Pinto, F.F., Lobato, Z.I.P., Nascimento, E.F., Rocha, M.A., Barbosa, C.N. 2003. Detecção do circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES (Goiás, Anais....Goiás: ABRAVES,2003), pp. 109-110.
- Protein Research Products, K. 2009. Technical Guide for ELISA - Protocols – Troubleshooting (Disponível em: <http://www.kpl.com/docs/techdocs/KPL%20ELISA%20Technical%20Guide.pdf>).
- Ramamoorthy, S., Meng, X.J., 2009, Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev* 10, 1-20.
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., Segales, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintant, J., Folch, J.M., Plana-Duran, J., Mankertz, A., Domingo, M., 2000, Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146, 762-764.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1659 p.
- Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M., 2005, Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111, 223-229.
- Segales, J., Domingo, M., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
- Shang, S.B., Jin, Y.L., Jiang, X.T., Zhou, J.Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y., 2009, Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol Immunol* 46, 327-334.
- Shang, S.B., Li, Y.F., Guo, J.Q., Wang, Z.T., Chen, Q.X., Shen, H.G., Zhou, J.Y., 2008, Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2. *Res Vet Sci* 84, 150-157.
- Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K., Asai, T., 2006, Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 278-280.
- Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I., 2003, PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65, 405-408.
- Shuai, J., Li, X., Chen, N., Chen, X., Fang, W., 2008, Characterization and potential use of truncated PCV2 capsid protein and its polyclonal antibody for diagnosis of PCV2 infections. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48, 85-90.
- Silva Júnior, A., Braga, D. A. M., Silva, F.M.F., Myrra, L.V., Fietto, J.L.R., Vargas, M.I., Nero, L.A., Almeida, M.R., 2009. Detection of Porcine Circovirus 2 DNA by real time polymerase chain

- reaction in 1978 brazilians archived porcine tissues. In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. Virus Reviews and Research.
- Silva Júnior, A., Castro L, A., Chiarelli-Neto, O., Silva FM, F., Vidigal PM, P., Moraes MP., 2009, Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. *Pesq. Vet. Bras* 29, 76-82.
- Sobestiansky, J., Barbarino JR, P., Seyboth, L., Matos, M., 2002, Circovirose suína e circovírus suíno. *Sanidade em Foco* 4, 52.
- Song, Y., Jin, M., Zhang, S., Xu, X., Xiao, S., Cao, S., Chen, H., 2007, Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 119, 97-104.
- Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008, Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378, 311-322.
- Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2001, Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291, 152-160.
- Studdert, M., 1993, Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Australian Veterinary Journal* 70, 121-122.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W., 1986, Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91, 271-276.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987, Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96, 39-57.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochofermann, G., 1974, Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt Fuer Bakteriologie (Originale A)* 226, 153-167.
- Trundova, M., Celer, V., 2007, Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes* 34, 199-204.
- Vidigal, P.M.P., 2008, Aplicação das ferramentas de bioinformática na análise dos genomas dos Circovírus suíno 1 e 2. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Viçosa. Orientador: Márcia Rogéria de Almeida.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005, Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115, 388-398.
- Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B.M., Cottrell, T.S., Ellis, J.A., Allan, G.M., 2000, Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12, 400-405.
- Wilson, M.B., Nakane, P.P., 1978, Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques* (Knapp, W., Holubar, K., and Wick, G., eds.), 215-224.
- Wright, P.F., Nilsson, E., Van Rooij, E.M., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1993, Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech.* 12,435-50.

- Wu, P.C., Chien, M.S., Tseng, Y.Y., Lin, J., Lin, W.L., Yang, C.Y., Huang, C., 2008, Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. *J Biotechnol* 133, 58-64.
- Zhou, J.Y., Shang, S.B., Gong, H., Chen, Q.X., Wu, J.X., Shen, H.G., Chen, T.F., Guo, J.Q., 2005, In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J Biotechnol* 118, 201-211.