

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

INFECÇÃO POR PCV3 EM SUÍNOS NO BRASIL

FRANCIÉLI ADRIANE MOLOSSI

PORTO ALEGRE

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

INFECÇÃO POR PCV3 EM SUÍNOS NO BRASIL

FRANCIÉLI ADRIANE MOLOSSI

**Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências Veterinárias na
área de concentração em Medicina
Veterinária Preventiva e Patologia:
Patologia Animal e Patologia Clínica**

**Orientador: Prof. Dr. David
Driemeier**

**Co-orientador: Prof. Dr. Saulo
Petinatti Pavarini**

PORTO ALEGRE

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Molossi, Franciéli Adriane
Infecção por PCV3 em suínos no Brasil / Franciéli
Adriane Molossi. -- 2023.
132 f.
Orientador: David Driemeier.

Coorientador: Saulo Petinati Pavarini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. doenças de suínos. 2. PCV3. 3. vasculite. 4.
imonoquímica. 5. doença viral. I. Driemeier,
David, orient. II. Pavarini, Saulo Petinati,
coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de receber esse grandioso presente que é a vida e poder aprender e evoluir com as maravilhas e adversidades encontradas pela jornada. À minha família, em especial aos que me geraram, Genuino e Maria, obrigada por me ensinarem a alcançar meus objetivos com força e determinação.

À toda a equipe do Setor de Patologia Veterinária (SPV) da UFRGS, um imenso obrigado pelos anos de convívio, companheirismo e muito aprendizado, principalmente ao Professor David Driemeier, meu orientador, que sempre me proporcionou muito aprendizado, muitas oportunidades e é um dos meus exemplos de excelência profissional aliada a humildade. Agradeço também ao Professor Saulo Pavarini, meu co-orientador, pelo vasto aprendizado proporcionado, não só sobre patologia, mas também escrita científica. Agradeço a Professora Luciana Sonne e ao Professor Welden Panziera, por todo aprendizado proporcionado ao longo desses 4 anos. Agradeço a Dra Marcele Bandinelli por toda ajuda ao longo desses anos e por me proporcionar muito aprendizado em citologia e imunohistoquímica.

Obrigada a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente na realização dos trabalhos que compõem essa tese. Sem vocês nada disso teria acontecido. Agradeço muito o Bruno que sempre me ajudou bastante na realização das necropsias, procesamento, leitura de lâminas e delineamento dos trabalhos. À Agroceres que financiou boa parte dos exames complementares relacionadas a esta tese, especialmente através do MV, Me. Luciano Brandalise, que foi o suporte necessário para a realização das pesquisas e também ao CEDISA Concórdia, pela parceria, especialmente a Dra Carolina Pisseti que foi fundamental na realização por PCR's; e à equipe do Professor Claudio Canal, que realizou uma parte dos PCR's. Ao professor Fábio Vanucci pela realização das hibridizações *in situ*, e por me proporcionar oportunidades muito enriquecedoras.

Agradecimento especial a Bianca, por ter sempre me ajudado, tanto dentro do SPV, como fora dele. Agradeço do fundo do coração a minha família e aos meus colegas e amigos que estiveram do meu lado e sempre me ajudaram muito na pior fase da minha vida quando tive um problema grave de saúde, no início do doutorado, especialmente a Bianca, Júlia, Luan, Camila, Regina, Jacqueline e Marina. Ao professor David também que foi bem compreensivo com a situação. Agradeço também aos amigos/colegas mais recentes do setor, pelo convívio, parceria e aprendizados, Igor, Carol, Milena, Stella, Francisca e Eryca.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta meu muito obrigado, recebam o meu carinho com a frase do filósofo grego Antístenes: “Gratidão é a memória do coração”.

RESUMO

O circovírus suíno (PCV) está distribuído mundialmente, e quatro espécies já foram identificadas em suínos: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4, dos quais o PCV1 é considerado não patogênico, o PCV4 ainda está em fase de elucidação sobre seu papel como causador de doença clínica; e os PCV2 e PCV3 são comprovadamente patogênicos. Entretanto, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, causam doenças diferentes. O PCV3 já foi descrito em diversos países relacionado a aumento da mortalidade de porcas, falhas reprodutivas, síndrome da dermatite e nefropatia suína, inflamação multissistêmica, miocardite, sinais respiratórios e gastrointestinais. O objetivo do presente estudo é descrever e caracterizar aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos da infecção por PCV3 em leitões e fetos abortados no Brasil, e descrever as características moleculares do agente. Nessa tese estão incluídos 5 manuscritos abordando diferentes aspectos da infecção por PCV3 em suínos no Brasil, além de uma patente, resultado do desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica para auxiliar na realização do diagnóstico de PCV3. Os dois primeiros manuscritos tiveram o objetivo de descrever os achados epidemiológicos e clínico-patológicos, bem como caracterizar molecularmente o agente etiológico envolvido, em casos de infecção por PCV3 em leitões e como causa de abortos no Brasil. O diagnóstico foi confirmado através de técnica de hibridização *in situ* (ISH). O terceiro manuscrito apresenta o desenvolvimento inovador da técnica de imunohistoquímica para o diagnóstico de PCV3, somado a descrição de lesões microscópicas detalhadas de casos de infecção por PCV3 e carga viral. O quarto manuscrito traz uma seleção de apenas casos confirmados de PCV3 em leitões, através da ISH, com objetivo de esclarecer o tipo de resposta inflamatória envolvida na infecção pelo agente. Esse estudo foi conduzido com a realização de técnicas de imunohistoquímica para Iba-1, CD20, CD3 e também caspase 3. Os resultados demonstraram que a resposta inflamatória que predomina na infecção por PCV3 é de histiócitos e linfócitos B. A apoptose não foi um achado marcante. Esses achados contribuem para o auxílio a elucidação da patogenia da doença. O quinto manuscrito teve o objetivo de estudar e descrever lesões musculares em leitões com doença clínica associada a PCV3. Foram selecionados dois grupos de 22 leitões cada, no grupo 1 foram selecionados leitões neonatos ou abortados, com orelhas rotadas caudalmente e fraqueza (grupo “throwback ears” TE) e no grupo controle leitões provenientes das mesmas propriedades, mas sem apresentação de nenhum sinal clínico. Ambos os grupos foram positivos para PCV3 no qPCR, no entanto, os leitões do grupo TE demonstraram lesões microscópicas; e a carga viral foi significativamente maior do que os leitões do grupo controle. As lesões musculares esqueléticas e cardíacas foram significativamente maiores no grupo TE do que no grupo controle.

Palavras-chave: doenças de suínos, doença viral, PCV3, inflamação perivascular multissistêmica, vasculite, pneumonia, miocardite, miosite, imunohistoquímica.

ABSTRACT

The porcine circovirus (PCV) is spread worldwide, and four species have already been identified in pigs: PCV1, PCV2, PCV3 and PCV4, of which PCV1 is considered non-pathogenic; PCV4 is still in the phase of elucidation about its role as a cause of clinical illness; and PCV2 and PCV3 are proven to be pathogenic. However, despite belonging to the same genus, they cause different diseases. PCV3 has already been described in several countries related to increased mortality in sows, reproductive failures, porcine dermatitis and nephropathy syndrome, multisystemic inflammation, myocarditis, respiratory and gastrointestinal signs. The aim of the present study was to describe and characterize epidemiological, clinical and pathological aspects of PCV3 infection in piglets and aborted fetuses in Brazil, and to describe the molecular characteristics of the agent. This thesis includes 5 manuscripts about different aspects of PCV3 infection in pigs in Brazil, in addition to a patent, that is the result of the development of the immunohistochemical technique to aid in the diagnosis of PCV3. The first two manuscripts aimed to describe the epidemiological and clinical-pathological findings, as well as molecularly characterize the etiological agent involved in cases of PCV3 infection in piglets and as a cause of abortions in Brazil. The diagnosis was confirmed using the in situ hybridization (ISH) technique. The third manuscript presented the innovative development of the immunohistochemical technique for the diagnosis of PCV3, in addition to the description of detailed microscopic lesions of cases of PCV3 infection and viral load. The fourth manuscript brings a selection of only confirmed cases of PCV3 in piglets, through ISH, with the aim of clarifying the type of inflammatory response involved in the infection by the agent. This study was conducted with immunohistochemical techniques for Iba-1, CD20, CD3 and also caspase 3. The results showed that the inflammatory response that predominates in PCV3 infection is histiocytes and B lymphocytes. Apoptosis was not a finding memorable. These findings contribute to help elucidate the pathogenesis of the disease. The fifth manuscript aimed to study and describe muscle injuries in piglets with clinical disease associated with PCV3. Two groups of 22 piglets each were selected, in group 1 newborn or aborted piglets with caudally rotated ears and weakness (throwback ears group TE) and in the control group piglets from the same farms, but without any clinical signs. Both groups were positive for PCV3 in qPCR, however, piglets in the TE group showed microscopic lesions; and viral load was significantly higher than control piglets. Skeletal muscle and cardiac injuries were significantly greater in the TE group than in the control group.

Keywords: swine diseases, viral disease, PCV3, multisystem perivascular inflammation, vasculitis, pneumonia, myocarditis, myositis, immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS	10
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	11
4. REFERÊNCIAS	12

1. INTRODUÇÃO

O gênero circovírus (Circoviridae), caracteriza-se por ser um vírus pequeno (diâmetro variando de 15-25 nm), não-envelopado, icosaédrico e com o genoma DNA circular de fita simples (ROSARIO *et al.*, 2017). O DNA viral possui pelo menos 3 *functional open reading frames* (ORF): a ORF1 codifica as proteínas Rep envolvidas na replicação viral, a ORF2 codifica a proteína do nucleocapsídeo (NC), e a ORF3 codifica a proteína que induz a apoptose e está envolvida diretamente na patogênese viral *in vivo* (GAGNON *et al.*, 2007).

Circovírus estão distribuídos mundialmente, e quatro espécies (PCV1, PCV2, PCV3 a PCV4) já foram descritas. O PCV-1 foi descoberto nos anos 1980, como um contaminante de cultura celular, sem aparente impacto na saúde animal (TISCHER *et al.* 1982). No final da década de 1990, o PCV2 foi descrito e relacionado a diferentes síndromes clínicas, como a síndrome multissistêmica do definhamento, pneumonia proliferativa necrosante e nefropatia e dermatite dos suínos (CHEUNG 2003; OPRIESSNIG, MENG & HALBUR, 2007; HANSEN *et al.* 2010). No Brasil, o PCV2 foi diagnosticado pela primeira vez pela Embrapa Suínos e Aves, Santa Catarina, em 2000 (ZANELLA *et al.* 2003). Desde então, a circovirose causada por PCV2 é reconhecida em rebanhos suínos dos principais estados produtores brasileiros, e com enorme impacto econômico negativo. O PCV4 ainda está em fase de elucidação sobre seu papel como causador de doença clínica (ZHANG *et al.* 2020).

PCV3 foi detectado originalmente em 2015, nos EUA, em uma granja com mortalidade elevada em porcas, abortos e sinais clínicos compatíveis com síndrome da dermatite e nefropatia suína (PALINSKI *et al.* 2017). Quase concomitantemente, outro grupo de pesquisa dos EUA descreveu PCV3 em 3 suínos de diferentes idades, variando de 3 a 9 semanas, com inflamação multissistêmica e miocardite (PHAN *et al.* 2016). Desde então, o vírus já foi descrito em muitos países da Europa (FUX *et al.* 2018, FACCINI *et al.* 2017, FRANZO *et al.* 2018, KWON *et al.* 2017, YE *et al.* 2018, KU *et al.* 2017), Ásia (HAYASHI *et al.* 2018, KIM *et al.* 2018, ZHAO *et al.* 2018, STADEJEK *et al.* 2017, YUZHAKOV *et al.* 2018, KEDKOVID *et al.* 2018) e no Brasil (TOCHETTO *et al.* 2018; SANTO *et al.* 2020).

Outras apresentações clínicas/patológicas também foram descritas e associadas a infecção por PCV3, como distúrbios respiratórios, gastrointestinais e neurológicos (ZHAI *et al.* 2017). Entretanto, na maioria dos estudos não há diagnóstico completo e definitivo, mas apenas a detecção do genoma viral em vários suínos afetados por diferentes sinais clínicos. Embora o genoma viral tenha sido detectado nos diferentes órgãos de suínos, isso não comprova seu papel

como causa das doenças descritas como relacionadas a PCV3. O vírus também foi detectado em suínos aparentemente saudáveis (PALINSKI et al 2017; Zheng *et al* 2017; FRANZO *et al* 2018), sendo difícil concluir sobre o potencial patogênico e o impacto econômico da infecção por PCV3 em suínos, devido à dificuldade de comprovação do diagnóstico.

Contudo, recentemente, nos Estados Unidos, comprovou-se a associação do PCV3 com falhas reprodutivas, encefalite e miocardite in leitões perinatais, e síndrome da dermatite e nefropatia e periarterite, pela demonstração da replicação do vírus em diversos órgãos de suínos doentes e de fetos abortados através da hibridização *in situ* (ARRUDA et al. 2019).

Com o aumento da produção suína, o risco de aparecimento de doenças emergentes aumenta, principalmente através da introdução de material genético (animais reprodutores e sêmen) e grãos importados. Há necessidade do reconhecimento clínico destas enfermidades pelos médicos veterinários para permitir um diagnóstico definitivo e com isso uma ação de controle, eliminação e prevenção de disseminação da doença no rebanho. O exame *post-mortem* é essencial para o diagnóstico da enfermidade, e a realização de exame histológico e de exames complementares, como testes imuno-histoquímicos e moleculares, aumenta as chances de diagnóstico definitivo e acurado, auxiliando os médicos veterinários a combaterem a enfermidade, e avaliar o impacto econômico que o vírus causa sobre as perdas neonatais e falhas reprodutivas no rebanho suíno do Brasil.

Os objetivos desse estudo foram realizar a caracterização epidemiológica, clínica e patológica de leitões e abortos com doença clínica associada a PCV3 e desenvolver inovadora técnica de imunohistoquímica para auxiliar no diagnóstico da doença.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos aplicados, os resultados e as discussões da pesquisa serão apresentados em cinco artigos científicos.

Artigo 1: A putative PCV3-associated disease in piglets from Southern Brazil

Artigo 2: PCV3-associated reproductive failure in pig herds in Brazil

Artigo 3: Porcine circovirus type 3: immunohistochemical detection in lesions of naturally affected piglets

Artigo 4: Immunophenotype of the inflammatory response in neonatal piglets with naturally PCV3-associated disease

Artigo 5: Muscular lesions in piglets with PCV3-associated disease

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O PCV3 foi comprovadamente associado ao quadro clínico-lesional em leitões e como causador de abortos pela primeira vez no Brasil.
- Os leitões afetados apresentavam dispneia, orelha rotada caudalmente e fraqueza.
- Macroscopicamente, os leitões apresentam orelhas rotadas caudalmente e pulmões vermelhos e não-colabados.
- Microscopicamente, os leitões apresentam periarterite linfocítica multissistêmica, as vezes com vasculite, pneumonia intersticial linfocítica, gliose, miocardite e miosite.
- Através da árvore filogenética montada com o resultado do sequenciamento da ORF2 do vírus, identificou-se o clade PCV3a, e os putativos PCV3b e PCV3c.

4. REFERÊNCIAS

ARRUDA, B., *et al.* PCV3-associated disease in the United States swine herd. **Emerging Microbes & Infections**. v. 8, p. 684-698, 2019.

CHEUNG, A.K. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. **Virology**. v.310, p.41-49, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J.R., *et al.* Estudo da Ocorrência de Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) em Suínos Vivos ou em Materiais com Suspeita Clínica de Circovirose Suína Enviados para Diagnóstico. Comunicado técnico 339, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2003.

FACCINI, S., *et al.* Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in Italy. **Transbound Emerg Dis**. v. 64, p. 1661-1166, 2017.

FRANZO, G., *et al.* Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. **Transbound Emerg Dis**. v. 65, p. 602-606, 2018.

FUX, R., *et al.* Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. **Virology Journal**, v. 15, p. 25, 2018.

GAGNON, C.A. *et al.* The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **Can Vet J**. v. 48, n. 8, p. 811-819, 2007.

HANSEN, M.S., *et al.* Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. **Vet Microbiol**. v. 144, p. 203-209, 2010.

HAYASHI, S., *et al.* First detection of porcine circovirus type 3 in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 9, p. 1468-1472, 2018.

KWON, T., *et al.* Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. **Vet Microbiol**. v. 207, p. 178-180, 2017.

KIM, S.H., *et al.* Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea. **J. Vet Sci**. v. 19, p. 21-724, 2018.

KEDKOVID, R., *et al.* Porcine circovirus type 3 (PCV3) shedding in sow colostrum. **Vet Microbiol**. v. 220, p. 12-17, 2018.

KU, X., *et al.* Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 64, n. 3, p. 703-708, 2017.

OPRIESSNIG, T., *et al.* Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. **Journal of Comparative Pathology**. v. 134, p. 105-110, 2006.

PALINSKI, R., *et al.* A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. **Virology Journal**. v. 91, p. e01879-16, 2017.

PHAN, T.G., *et al.* Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Virology Journal**. v. 13, p. 184, 2016.

ROSARIO, K., *et al.* Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**. v. 162, n. 5, p. 1447-1463, 2017.

SANTO, A.C.D., *et al.* Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. **Microbial Pathogenesis**. v. 141, p. 104027. 2020.

STADEJEK, T., *et al.* First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. **Transbound Emerg Dis**. v. 64, p. 1350–1353, 2017.

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

TOCHETTO, C., *et al.* Full-genome sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. **Transboundary and Emerging Disease**. v. 65, p. 5-9, 2018.

YE, X., *et al.* Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. **Virol Sin**. v. 54, p. 466–469, 2018.

YUZHAKOV, A.G., *et al.* First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia. **Virus Genes**. v. 54, p. 608–611, 2018.

ZHAI, S.L., *et al.* Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. **Virology Journal**. v. 14, p. 222, 2017.

ZHANG, H-H., *et al.* Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan province, China. **Transbound Emerg Dis**. v. 67, p. 1057-1061, 2020.

ZHAO, D. *et al.* Retrospective survey and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in Jiangsu province, China, 2008 to 2017. **Arch Virol**. v. 163, p. 2531–2538, 2018.

ZHENG, S. *et al.* The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. **Transbound Emerg Dis**, v. 64, p.1337-41, 2017.