

## Descrição de transmissão horizontal e vertical de *Porcine circovirus 2b* (PCV2b) em camundongos (CH3/Rockefeller) inoculados experimentalmente

Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro<sup>1\*</sup>; Katarina Yamada<sup>2</sup>; Tais Fukuta da Cruz<sup>3</sup>; Camila Oliveira<sup>2</sup>; Ana Julia Silva e Alves<sup>1</sup>; Rosely Bianca dos Santos Kuroda<sup>1</sup>; João Pessoa Araújo Junior<sup>3</sup>; Leonardo José Richtzenhain<sup>2</sup>

**RESUMO** - Os estudos de susceptibilidade de camundongos para a infecção por PCV2, apesar da importância da infecção de PCV2 em suínos, ainda são controversos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de transmissão horizontal e vertical de PCV2b em camundongos infectados experimentalmente. Foram realizados dois experimentos. No experimento 1 um camundongo macho infectado cobriu uma fêmea e os filhotes foram testados para a presença de DNA viral para avaliar a infecção vertical. No experimento 2, camundongos de 21 dias de idade inoculados com PCV2 foram alocados com não infectados, ou seja, contactantes e para avaliar a infecção horizontal. Posteriormente, os camundongos contactantes foram testados para a presença de DNA de PCV2. Amostras coletadas nos experimentos 1 e 2 foram submetidas a extração de DNA e, posteriormente, testadas para a presença de DNA viral pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). No experimento 1, após o período de gestação, a fêmea pariu 10 camundongos dos quais 60% (6/10) foram positivos pela PCR para PCV2. No experimento 2, tanto animais inoculados quanto os contactantes, não apresentaram alterações clínicas e lesões macroscópicas de infecção por PCV2, mas o DNA viral foi recuperado pela PCR em quatro dos cinco animais do grupo contactante. A detecção de DNA viral em filhotes de fêmeas primo-infectadas e em camundongo que tiveram contato com camundongo inoculados demonstrou que PCV2 pode ser transmitido vertical e horizontalmente.

Palavras-chave: animais de laboratório, epidemiologia, infecção experimental, vírus

## Description of horizontal and vertical transmission in mice PCV2b (CH3 / Rockefeller) experimentally inoculated

**ABSTRACT** - The studies of mice susceptibility to PCV2 infection are still controversial, despite the importance of PCV2 infection in pigs. Therefore, the aim of this study is to verify the occurrence of horizontal and vertical transmission of PCV2b in mice experimentally infected. Two experiments were performed. In experiment 1 an infected male mice covered a female to verify vertical infection. The pups were tested to detected viral DNA. In experiment 2 the 21 days of age mice were inoculated with PCV2 and allocated with uninfected, i.e. contactantes, to evaluate the horizontal infection. Subsequently, the contactants and inoculated mice were tested for PCV2 DNA. The samples collected from both experiments had their DNA extracted and were further submitted to polymerase chain reaction (PCR). In experiment 1, after the gestation period, the female farrowed 10 mices of which 60% (6/10) were positive for the agent. In experiment 2, both the inoculated and the contacts animals showed no clinical changes and gross lesions of PCV2 infection, but viral DNA was recovered in four of the five animals of the contactant group. The detection of viral DNA in the offspring of the primo-infected females and in the mice that had contact with inoculated mice demonstrated that PCV2 can be transmitted vertically and horizontally.

Keywords: epidemiology, experimental infection, laboratory animals, virus

<sup>1</sup>Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, Rua Ministro Nelson Hungria, 541 Morumbi, CEP 05690-050, São Paulo/Brasil - alessandramarnie@gmail.com - \*Autor para correspondência;

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo; <sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

## INTRODUÇÃO

O circovírus suíno (PCV – *Porcine circovirus*) foi identificado pela primeira vez em 1974, como um picornavírus que contaminava permanentemente culturas celulares de rim de suíno PK-15 (ATCC CCL 33) (Tischer et al. 1987).

São descritas duas espécies de PCVs em suínos: (1) *Porcine circovirus 1* (PCV1), o qual é considerado não patogênico e o (2) *Porcine circovirus 2* (PCV2), descrito pela primeira vez em 1996 no Canadá, sendo associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) (Opriessnig et al. 2007).

O PCV1 e PCV2 são vírus pequenos com aproximadamente 17 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, não envelopados e possuem um DNA de fita simples, com estrutura circular fechada covalentemente. Após infecção, o DNA de fita simples é convertido num intermediário de cadeia dupla (dsADN), também conhecido como forma replicativa. A região que contém a origem de replicação encontra-se delimitada por duas regiões de leitura aberta (*open reading frames* - ORFs), ORF1 (gene Rep - replicação) e ORF2 (gene Cap - capsídeo), orientadas em sentidos contrários, resultando em uma organização genômica ambisenso, separadas por uma região intergênica (Cheung 2012).

A infecção subclínica de PCV2 implica na presença de baixa quantidade de agente associado à ausência ou presença de poucas lesões. Na infecção sistêmica é observada a perda de peso ou diminuição da taxa de crescimento, icterícia e definhamento. Além desses sinais mais comuns, se observa dificuldade respiratória, tosse e diarreia. O comprometimento respiratório é observado, principalmente, em leitões entre oito a 26 semanas de idade e é associado a outros patógenos respiratórios. Observa-se a diminuição da taxa de crescimento, aumento da conversão alimentar, febre, tosse e dispneia. No sistema digestório, as lesões associadas ao PCV2 são frequentes em leitões com oito a 16 semanas de idade e se caracteriza por enterite, espessamento da parede intestinal e aumento dos linfonodos. Na fase de reprodução, o PCV2 está associado a distúrbios reprodutivos onde se observa aumento de abortamento, natimortos e mumificação fetal e aumento da mortalidade na fase pré-desmame (Opriessnig et al. 2007, Segalés et al. 2013).

A diversidade de manifestações clínicas da infecção por PCV2 se deve às diferenças nas idades dos animais acometidos e as co-infecções e suas associações com o PCV2. Adicionalmente, nos últimos anos, novos os genótipos de PCV2 tem sido descritos, dentre eles o PCV2a, PCV2b e PCV2c. Os dois primeiros são amplamente disseminados na população suína, apresentando uma soroprevalência que varia de 50 a 100%. O PCV2c foi descrito apenas na Dinamarca em amostras de arquivo da década de 80 (Dupont et al. 2008, Segalés et al. 2013).

O PCV2 tem grande impacto na suinocultura, uma vez que afeta o desempenho dos animais e, conseqüentemente, a produtividade da granja (Gillespie et al. 2009, Lorincz et al. 2010). A transmissão do vírus ocorre verticalmente e horizontalmente, sendo o DNA viral detectado em *swab* nasal, bronco-traqueal, orofaríngeo, fecal e da urina de suínos naturalmente e experimentalmente infectados com PCV2. O contágio ocorre pelo contato direto que foi observado

tanto em animais a campo quanto infectados experimentalmente. A transmissão vertical intra-uterina resulta em leitões com viremia ou persistentemente infectados ao nascimento. No sêmen, o vírus foi detectado e isolado em animais infectados experimentalmente cinco dias após a inoculação (Madson; Opriessnig 2011).

PCV2 foi detectado em javalis em taxas similares a das encontradas em suínos domésticos. Em roedores, a alta prevalência de PCV2 em levantamentos a campo, demonstrou a importância desses animais na transmissão indireta e na persistência do agente na granja (Rose et al. 2012).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a susceptibilidade de camundongos à infecção por PCV2, na qual diferentes linhagens de camundongo (BALB/c, C57BL/6, C3H/HeN e ICR-CD1) foram utilizadas como modelos biológicos para pesquisa de PCVAD, porém, a infecção de camundongo é, ainda, controversa (Kiupel et al. 2001, Quintana et al. 2002, Opriessnig et al. 2009). Portanto, o objetivo do presente estudo é verificar a ocorrência de transmissão horizontal e vertical de PCV2b em camundongos infectados experimentalmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) Inóculo

O vírus da cepa PCV2b (GenBank número KC924956) foi isolado em cultivo celular de célula de testículo suíno (ST) livre de PCV1. O isolado foi quantificado por reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) e o sequenciamento classificou-o em PCV2b. O inóculo foi negativo por reação em cadeia da polimerase (PCR) para os seguintes agentes: *Porcine circovirus 1* (PCV1), *Porcine parvovirus1* (PPV1), *Torque teno sus virus 1* (TTSuV1), *Torque teno sus virus k2* (TTSuVk2), *Suid herpesvirus 1* (SuHV-1), *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica* (dados não demonstrados) (Baldin 2012).

### b) Fluxograma do experimento

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo protocolado sob o número 1986/2010.

#### *Experimento 1 – transmissão vertical*

Foram utilizados dois camundongos (*Mus musculus*), um macho e uma fêmea, da linhagem CH3/Rockefeller com idade de vinte e um dias obtidos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O macho foi inoculado com 25 µL ( $4,89 \times 10^6$  partículas virais/mL) de PCV2b nos dias 0, 3 e 5 por via intra-nasal. A fêmea, não inoculada, permaneceu na mesma caixa do macho por 35 dias após a inoculação. Os animais receberam água e ração “ad libitum” e foram monitorados diariamente (Figura 1). Após esse período, a fêmea foi transferida para outra caixa, onde permaneceu até a parição. Aos sete dias após o nascimento, 10 camundongos nascidos

foram eutanasiados por *overdose* da associação de Ketamina/Xilasina administrada por via intraperitoneal e coletadas as amostras de um *pool* de órgãos (baço, fígado, coração, pâncreas, rim e intestino).

#### *Experimento 2 - Transmissão horizontal*

Foram utilizados dez camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas da linhagem CH3/Rockefeller com idade de vinte e um dias obtidos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, os quais foram divididos em dois grupos (G1 e G2). Os animais do G1 (n= 5) foram inoculados com 25 µL ( $4,89 \times 10^6$  partículas virais/mL) de PCV2b por via intra-nasal nos dias 0, 3 e 5; os do G2 (n= 5) não foram inoculados e permaneceram na mesma caixa dos inoculados (Figura 1). Durante os 42 dias de experimento, os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram monitorados diariamente. Aos 63 dias de idade, os animais do G1 e G2 foram eutanasiados por *overdose* da associação de Ketamina/Xilasina e amostras do sistema nervoso central (SNC), timo, baço, coração, pulmão, fígado, pâncreas, intestino, órgão reprodutor e rins foram coletados.

#### **c) Extração de DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

As amostras de tecidos foram homogeneizadas usando um Stomacher 80 em 20% (v/w) de tampão TE (10 mM Tris - HCl, EDTA 1 mM, pH 8,0) e armazenada a -20 °C até serem testadas. O DNA viral foi extraído utilizando proteinase K e fenol:clorofórmio conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

A reação para a obtenção do *amplicon* foi conduzida em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de DNA extraído, 12,5 µL de *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* (2 X) (Fermentas, EUA), 10 pmol de cada *primer* (SybPCV2F 5' ATA ACC CAG CCC TTC TCC TAC C 3' / SybPCV2R 5'GGC CTA CGT GGT CTA CAT TTC C 3') e água livre de DNase q.s.p. Essas condições permitiram amplificar um fragmento de 145 nt da região ORF2 do PCV2 (Yang et al. 2007).

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200 (*PeltierThermalCycler MJ Research* (Bio-Rad, EUA), nas seguintes condições: 94 °C/ 5 minutos, seguido de 35 ciclos (94 °C/30 segundos, 51 °C/30 segundos e 72 °C/1 minuto) e uma extensão final a 72 °C/5 minutos. Os controles positivos e negativos da reação foram plasmídeo com um inserto do PCV2 e água ultrapura estéril, respectivamente.

As amostras foram testadas em paralelo para o gene da  $\beta$ -actina e foram positivos descartando a possibilidade de resultados falso-negativos como consequência de falha na extração de DNA.

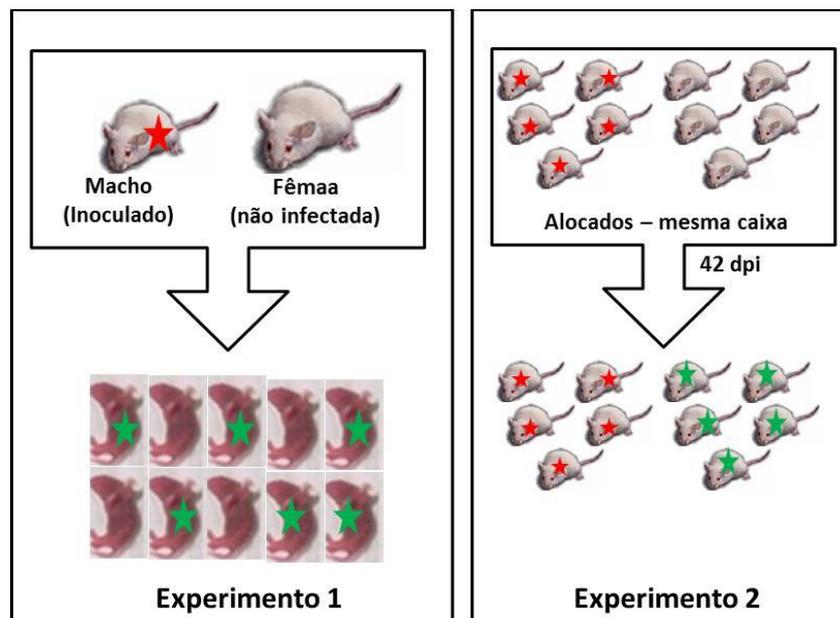
#### **d) Detecção do produto amplificado**

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de transiluminação do gel de agarose a 2% em luz ultravioleta, após sua coloração em uma solução de brometo de

etídeo a uma concentração de 0,5 µg/mL (Sambrook et al. 1989). O comprimento dos amplificados foi comparado a um padrão de 100 pb.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos estudos de infecção experimental e de campo com PCV2 em roedores são contraditórios, mas demonstraram que estes são suscetíveis à infecção e disseminam o vírus. No experimento 1, uma fêmea negativa e não inoculada foi coberta por um camundongo macho inoculado e positivo para PCV2. A fêmea pariu 10 camundongos que foram testados para PCV2 pela técnica de PCR, dos quais 60% (6/10) foram positivos para o PCV2 (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema da transmissão vertical e horizontal. **Experimento 1** - Macho infectado com PCV2b aos 21 dias de idade ficou alocado na mesma caixa com fêmea não infectada. **Experimento 2** – Cinco camundongo infectados com PCV2b aos 21 dias de idade ficaram alocados com os não infectados. ★ Animais inoculados três vezes com PCV2b via intra-nasal. ★ Animais que se infectaram com PCV2b por transmissão vertical (experimento 1) ou horizontal (experimento 2)

Lorincz et al. (2010) obtiveram resultados diferentes em roedores infectados naturalmente com PCV2 obtidos em granjas de suínos. Os autores, durante um levantamento de PCV2 em roedores na Hungria, selecionaram algumas fêmeas prenhes e testaram seus filhotes para detecção de DNA PCV2, os quais foram negativos.

No entanto, essa discrepância de resultados pode estar associada à viremia e ao *status* imunológico dos animais adultos. Em suínos, surtos de infecção de PCV2 estão associados à introdução de marrãs e a rebanhos negativos para o agente. Esses animais são mais suscetíveis, uma vez que não possuem anticorpos protetores (Madson; Opriessnig 2011, Darwich; Mateus 2012).

Em suínos, a transmissão vertical ocorre quando a marrã se infecta via oro-nasal ou por sêmen contaminado. Há uma correlação positiva entre viremia e eliminação no sêmen, fezes e secreções nasais em suínos. Apesar da eliminação de PCV2 no sêmen ser intermitente, suínos infectados experimentalmente com PCV2 apresentam viremia após 7 a 14 dias, e durante esse período o DNA viral é detectado no sêmen com mais frequência (Madson; Opriessnig 2011). Portanto, a infecção da fêmea quando em contato com o macho infectado no presente experimento, pode ser resultante tanto de infecção pelo sêmen como pela via oro-nasal.

A transmissão vertical em suínos está associada à viremia durante a gestação, pois o PCV2 atravessa a placenta como vírus livre ou associado à célula, resultando na infecção dos fetos. Após a infecção, PCV2 é capaz de disseminar para outros fetos, sendo detectado em fetos com menos de 30 dias em suínos. A detecção de anticorpos anti-PCV2 neutralizantes ocorre a partir de 15 dias após a infecção. Estudos demonstraram que a presença de anticorpos neutralizantes diminui a viremia e detecção do DNA viral nas secreções e excreções, sendo esse um fator importante na transmissão do agente (Opriessnig et al., 2007, Madson; Opriessnig, 2011).

Assim, a infecção recente da fêmea no presente estudo, resultou na ausência e/ou insuficiente resposta imune humoral, que podem ter favorecido a viremia e, portanto, transmissão vertical.

No experimento 2, camundongos de 21 dias de idade foram alocados em contato com os infectados com PCV2. Durante o período de experimento, os animais não apresentaram alterações clínicas e durante a necropsia, não se observaram lesões macroscópicas de infecção de PCV2. No entanto, o DNA viral foi recuperado em quatro dos cinco animais do G2, em pelo menos um dos órgãos. Ressalta-se, ainda, que um animal apresentou sete dos dez órgãos testados para PCV2 positivos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição de DNA de PCV2 nos órgãos de camundongos contactantes (G2) com camundongos infectados (G1) durante o período de 42 dias

<b>Órgãos</b>	<b>Animal 6</b>	<b>Animal 7</b>	<b>Animal 8</b>	<b>Animal 9</b>
<b>Baço</b>	-	Pos	-	-
<b>Coração</b>	-	Pos	-	-
<b>Fígado</b>	-	-	Pos	-
<b>Pâncreas</b>	-	Pos	-	-
<b>Pulmão</b>	Pos	-	Pos	-
<b>Reprodutivo</b>	-	Pos	Pos	-
<b>Rim</b>	Pos	-	Pos	-
<b>SNC</b>	-	Pos	Pos	-
<b>Timo</b>	Pos	Pos	-	-
<b>Intestino Inicial</b>	-	-	Pos	-
<b>Intestino médio</b>	-	-	Pos	Pos
<b>Intestino final</b>	-	Pos	-	-

Pos = órgãos positivos para PCV2 pela técnica de PCR.

Lorincz et al. (2010) detectaram PCV2 em diferentes roedores obtidos em granjas de suínos na Hungria demonstrando que esses animais são suscetíveis ao vírus suscetíveis ao vírus.

Adicionalmente, vários estudos, com diferentes linhagens de camundongo (BALB/c, C57BL/6, C3H/HeN e ICR-CD1), demonstraram a susceptibilidade de camundongos à infecção por PCV2 (Kiupel et al. 2001, Quintana et al. 2002, Opriessnig et al. 2009). A detecção do DNA viral em diferentes órgãos por PCR foi relatada por Deng et al. (2011). O presente estudo, além de confirmar a suscetibilidade do camundongo, demonstrou que o PCV2 pode ser transmitido verticalmente e causar infecção em camundongos neonatos.

Em suínos, o contato direto entre os animais é a via mais eficiente na transmissão do PCV2, entretanto outras vias devem ser consideradas, como a transmissão através de secreções nasais, brônquicas e oculares, bem como pela saliva, leite, urina, sêmen e fezes (Yang et al. 2007). A detecção de DNA de PCV2 nos contactantes demonstra que o contato direto entre os animais infectados e suscetíveis é uma importante via de transmissão do PCV2 em camundongos.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que os animais do G2 se infectaram com PCV2 quando em contato com os animais inoculados (G1) durante o período de 42 dias após a inoculação.

## CONCLUSÕES

A detecção de PCV2 em filhotes obtidos de fêmea primo-infectada demonstra que é possível ocorrer transmissão vertical do vírus em camundongos. A recuperação DNA viral em diferentes órgãos de camundongos que tiveram contato com primo-infectados demonstrou que esse agente pode ser transmitido horizontalmente.

## REFERÊNCIAS

- Baldin CM. Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com *Circovirus* suíno 2. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.
- Cheung AK. Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Res.* 2012; 164(1-2):46-63.
- Darwich L, Mateu E. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 2012; 164(1-2):61-67
- Deng ZB, Wang ND, Xu DJ, Yuan AW, Ge M, Luo W, Xue LQ, Yu XL. Viral distribution and lesions in Kunming mice experimentally infected with porcine circovirus type 2b. *Vet Res. Commun.* 2011; 35(3):181-192.
- Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol.* 2008; 128(1-2):56-64.

- Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Met Intern Med*. 2009; 23(6):1151-63.
- Kiupel M, Stevenson GW, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL, Mittal SK. Viral Replication and Lesions in BALB/c Mice Experimentally Inoculated with Porcine Circovirus Isolated from a Pig with Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Vet Pathol*. 2001; 38(1):74-82.
- Lorincz M, Cságola A, Biksi I, Szeredi L, Dán A, Tuboly T. Detection of porcine circovirus in rodents. *Acta Vet Hung*. 2010; 58(2):265-268.
- Madson DM, Opriessnig T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev*. 2011; 12(1):47-65
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestation, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*. 2007; 19:591-615.
- Opriessnig T, Patterson AR, Jones DE, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG. Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to Porcine circovirus-2 infection and associated lesions. *Can J Vet Res*. 2009; 73:81-86.
- Patterson AR, Opriessnig T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*. 2010; 11(2):217-234.
- Quintana J, Balasch M, Segalés J, Calsamiglia M, Rodriguez-Arriola GM, Plana-Dúran J, Domingo M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res*. 2002; 33(2):229-237.
- Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*. 2012; 164(1-2):78-89.
- Sambrook J, Fitch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press: 1989. 65-69p.
- Segalés J, Kekarainen T, Cortey M. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol*. 2013; 165(1-2): 3-20.
- Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol*. 1987; 96(1-2):39-57.
- Yang ZZ, Habib M, Shuai JB, Fang WH. Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I based quantitative PCR. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007; 8(3):162-169.