



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA CAROLINA GOMES DUTRA DE SOUZA

**CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 E *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*
EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS
GERAIS, PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2021

TATIANA CAROLINA GOMES DUTRA DE SOUZA

**CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 E *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*
EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS
GERAIS, PARANÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (área de concentração Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina -
UEL, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- S729 Souza, Tatiana Carolina Gomes Dutra de .
CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 E MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PARANÁ, BRASIL / Tatiana Carolina Gomes Dutra de Souza. - Londrina, 2021.
91 f. : il.
- Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.
1. Circovírus suíno 3 - Tese. 2. Mycoplasma hyopneumoniae - Tese. 3. Infecção natural - Tese. 4. Javali - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

TATIANA CAROLINA GOMES DUTRA DE SOUZA

**CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 E *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*
EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS
GERAIS, PARANÁ, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra Alais Maria Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra Danielle Gava
Embrapa suínos e aves

Prof. Dra Juliana Sperotto Brum
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dra Daiane Güllich Donin
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 16 de setembro de 2021.

Este estudo foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves em Concórdia - SC, em parceria com o Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal pelo programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do professor Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

O projeto contou com recursos financeiros advindos das agências e órgãos de fomento à pesquisa, sendo eles:

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT
2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC
3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná/SETI
4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos/MCT

Dedico este trabalho...
aos meus pais, Olívia Silva Gomes (*in
memoriam*) e Geraldo de Souza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Sua Graça, nada teria sentido até aqui.

Ao Professor Dr. Amauri Alfieri pela orientação, oportunidade, ensinamentos e paciência durante o doutorado.

À Professora Dra. Alice Fernandes Alfieri pela organização da banca de qualificação.

À Professora Dra. Raquel Leme por estar sempre disponível, pelos ensinamentos, correções, conselhos e auxílio durante a seleção para o doutorado e por toda execução do projeto.

À Gisele da Silva Porto por ter me acolhido em sua casa, pelo auxílio e incentivo durante o doutorado.

Às colegas Juliana e Alais do Laboratório de Virologia Animal da UEL pela ajuda em todas as vezes que precisei.

Aos professores que constituíram a banca de qualificação e defesa.

Aos controladores, Rafael, Josué, Ricardo e ao médico veterinário e controlador de fauna exótica, Rodrigo Menon de Souza, que não mediram esforços para que as amostras biológicas utilizadas no estudo fossem colhidas e armazenadas de formas adequadas.

À Dra. Virgínia Santiago por ter me inspirado a investigar sobre a sanidade de suínos asselvajados para poder mitigar riscos à produção suinícola comercial, pelo acolhimento do projeto na Embrapa Suínos e Aves e pelo treinamento do grupo de controladores.

À Beatris Kramer e ao MSc. Marcos Antônio Zanella Morés pelos ensinamentos e imenso auxílio e dedicação nas análises laboratoriais.

À Dra. Rejane Schaefer pelo auxílio nas análises e correção do artigo de PCV-3.

À Neide Lisiane Simon pela paciência que teve comigo durante as análises e por me contar histórias de sucesso de outros estudantes que passaram pelo laboratório. Elas me fizeram acreditar que eu pudesse também ser capaz.

À Dra. Danielle Gava por não medir esforços para que o sequenciamento fosse realizado. Pela persistência, empenho e por me incentivar durante todo o percurso. Por compartilhar conhecimento, pelas correções da escrita e imensurável assessoria na análise genômica.

À amiga e professora Valeska Ruiz que como coordenadora do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Cescage me motivou e contribuiu para que eu pudesse diminuir e remanejar minha carga horária como docente para que eu conseguisse frequentar as disciplinas do doutorado.

Aos amigos e colegas de trabalho, Camila Borba, Juliana Ribas, José Sato, Edson Benke, Ton Kramer e Emanuella Pierozan pelo auxílio profissional e emocional nestes últimos anos.

Aos meus pais, professores e amantes da pesquisa, que desde pequena, me incentivaram a estudar.

Ao meu esposo, Emiliano Amadei, pela generosidade, incentivo, auxílio financeiro para publicação, e pela paciência e amor de como cuidou de mim e de tudo nos momentos em que minha correria de trabalho e estudo não me deixaram disponível.

Aos filhotes peludos, Toffee e Pós-doc, por lembrarem de que como é bom ter gratidão pelas coisas simples da vida.

A todos muito obrigada!

*“Mas aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças. Voam alto como
águias; correm e não ficam exaustos,
andam e não se cansam”*

(Is 40:29-31)

SOUZA, Tatiana Carolina Gomes Dutra de. **Circovírus suíno 3 e *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos asselvajados na região dos Campos Gerais, Paraná, Brasil.** 2021. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Circovírus suíno 3 (PCV-3) é um vírus emergente na produção de suínos e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) é considerado um dos patógenos respiratórios mais importantes na suinocultura mundial. Em todo o mundo há poucos trabalhos que avaliam a prevalência destes microrganismos em suínos asselvajados. Considerando as diferentes classes e características dos microrganismos avaliados, serão apresentados dois estudos: o primeiro aborda a investigação sobre a infecção por PCV-3 em suínos asselvajados de vida livre e o segundo sobre a infecção por Mhyo na mesma amostragem. Os animais foram manejados por controladores autorizados, entre 2017 e 2019 no estado do Paraná, Brasil, e georreferenciamento, sexo e peso foram registrados para cada animal. No primeiro estudo, *amplicons* com tamanho de 330 pb foram obtidos por PCR convencional em 7/70 (10,0%) amostras de soro avaliadas e confirmados específicos para PCV-3 por análise da sequência de nucleotídeos (nt). Em seguida, amostras de pulmão provenientes dos sete animais previamente positivos no soro foram também avaliadas por PCR. Destas, três amostras apresentaram boa quantificação de DNA e foram submetidas ao sequenciamento genômico completo para análise filogenética das cepas de PCV-3 identificadas. As três sequências completas obtidas foram agrupadas no clado “a” de PCV-3 e as sequências apresentaram 100% de identidade de nt entre si. As cepas de PCV-3 deste estudo possuem 99,5% a 99,8% e 98,8% a 100% de identidade de nt e similaridade de aminoácido (aa), respectivamente, com as sequências de genoma completo de cepas de todo o mundo. No segundo estudo, a presença de anticorpos anti-Mhyo foi avaliada por meio de kit comercial de ELISA indireto em 88 amostras de soro. Adicionalmente, a presença de lesões macroscópicas semelhantes à pneumonia enzoótica foi identificada em 27 amostras de pulmões, e a marcação pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi observada em 15/27 (55,5%) amostras. O teste do qui-quadrado e a intensidade da associação com o *odds ratio* e intervalo de confiança de 95% foram utilizados para avaliar as diferenças nas variáveis qualitativas entre os grupos (sexo e município). Os javalis jovens apresentaram maior seroprevalência para Mhyo do que os mais velhos ($p=0,005$). O município de Teixeira Soares diferiu na taxa de seroprevalência de Mhyo comparado aos municípios de Castro ($p<0,001$), Ponta Grossa ($p=0,004$) e Carambeí ($p<0,001$). As fêmeas apresentaram 6,79 vezes mais chance de possuírem lesões de consolidação pulmonar do que os machos ($p=0,004$). Dentre as amostras de pulmão com lesões avaliadas, 57,1% (8/14) e 53,8% (7/13) foram positivas para Mhyo por IHQ em animais provenientes dos municípios de Castro e Ponta Grossa, respectivamente, confirmando que as lesões macroscópicas identificadas foram ocasionadas pela infecção por Mhyo. Estes estudos demonstram a circulação de PCV-3 e de Mhyo em suínos asselvajados de vida livre, sugerindo que estes animais podem participar do ciclo epidemiológico destes microrganismos e constituem fator de risco para as criações comerciais de suínos domésticos.

Palavras-chave: javali; infecção natural; pneumonia enzoótica; PCR; IHQ; georreferenciamento.

SOUZA, Tatiana Carolina Gomes Dutra de. **Porcine circovirus 3 and *Mycoplasma hyopneumoniae* in free-living wild boars in the Campos Gerais Region, Paraná, Brazil.** 2021. 91 p. Thesis (Doctor's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Porcine circovirus 3 (PCV-3) is an emerging virus in pig production and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) is considered one of the most important respiratory pathogens of pigs worldwide. Few studies show the prevalence of these pathogens in free-living wild boars. Considering the different classes and characteristics of the microorganisms investigated, two studies are presented herein: the first addresses the investigation on PCV-3 infection in free-living wild boars, and the second is focused on Mhyo infection on the same sampling. The animals were managed by authorized controllers between 2017 and 2019, and georeferencing, sex, and weight were recorded for each animal. In the first study, amplicons with of 330 bp in length were obtained by conventional PCR in 7/70 (10.0%) serum samples and confirmed as PCV-3-specific by nucleotide (nt) sequencing. Then, lung samples from the seven animals previously positive in serum were also evaluated by PCR. Of these, three samples showed good DNA quantification and were submitted for amplification to determine the whole PCV-3 genome. The three complete nt sequences obtained were grouped into clade “a” of PCV-3 and the sequences showed 100% nt similarity to each other. The PCV-3 strains in this study have 99.5% to 99.8% and 98.8% to 100.0% nt identity and amino acid (aa) similarity, respectively, with the complete genome sequences of strains worldwide. In the second study, the presence of antibodies against Mhyo was evaluated in 88 serum samples using a commercial indirect ELISA kit. Additionally, the presence of macroscopic lesions similar to enzootic pneumonia were identified in 27 lung samples, and immunohistochemical (IHC) staining was observed in 15/27 (55.5%). The chi-square test and the intensity of the association with the odds ratio and 95% confidence interval were used to assess the differences in qualitative variables between the groups (sex and municipality). Young wild boars showed higher seroprevalence for Mhyo than older ones ($p=0.005$). Teixeira Soares municipality differed in Mhyo' seroprevalence compared to Castro ($p<0.001$), Ponta Grossa ($p=0.004$), and Carambeí ($p<0.001$). Females were 6.79 times more likely to have pulmonary consolidation lesions than males ($p=0.004$). Among the lung samples with lesions evaluated 57.1% (8/14) and 53.8% (7/13) were Mhyo-positive by IHC in animals from the municipalities of Castro and Ponta Grossa, respectively, confirming that the lesions macroscopic were caused by Mhyo infection. These studies show the circulation of PCV-3 and Mhyo in free-living wild boars, suggesting that these animals may participate in the epidemiological cycle of these microorganisms and constitute a risk factor for commercial domestic pig breeding.

Keywords: wild boar; natural infection; enzootic pneumonia; PCR; IHC; georeferencing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Patogenia da infecção pelo circovírus suíno 2 (PCV-2). PCV-2 replica em órgão linfóide proximal à infecção e ocasiona depleção linfóide. Em baixa viremia ocorre resolução da infecção, e em alta viremia ocorre a disseminação sistêmica do vírus. O prognóstico clínico é influenciado por fatores predisponentes que influenciam na interação vírus-hospedeiro, como os fatores individuais e de manejo. 26
- Figura 2** – a) Colônias de *Mycoplasma hyopneumoniae* em meio seletivo para este agente. b) Microscopia eletrônica de *Mycoplasma hyopneumoniae* em cílios traqueais suínos 37
- Figura 3** – Pulmão suíno. a) Hepatização pulmonar focal (seta) sugestiva de pneumonia enzoótica (posição dorsal). b) Hiperplasia do tecido linfóide peribronquiolar (seta), infiltrado inflamatório no lúmen bronquiolar e nos alvéolos adjacentes (*), HE 40
- Figura 4** – Pulmão suíno. a) Desenho esquemático em posição dorsal. b) Divisão de cada lobo pulmonar..... 40
- Figura 5** – Imuno-histoquímica para detecção do antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* em células epiteliais brônquicas de javali (Ponta da seta).10 µm. 42

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – <i>Circovirus porcino</i> (PCV-1, PCV-2, PCV-3 e PCV-4). Número de nucleotídeos (nt) do genoma viral e tamanho (aa) das proteínas codificadas das três principais sequências abertas de leitura (ORF1, ORF2 e ORF3) | 22 |
| Quadro 2 – Detecção de circovírus suíno 3 (PCV-3) em suínos comerciais de acordo com o sistema fisiológico e fase de produção | 28 |
| Quadro 3 – Detecção de circovírus suíno 3 (PCV-3) em suínos comerciais | 30 |
| Quadro 4 – Detecção de circovírus suíno 3 (PCV-3) em suínos asselvajados..... | 32 |
| Quadro 5 – Sequências de genoma completo de circovírus suíno 3 (PCV-3) identificadas em suínos domésticos brasileiros e em asselvajados disponíveis no GenBank..... | 33 |
| Quadro 6 – Circovírus suíno 3 (PCV-3) em coinfecção com outros patógenos em suínos..... | 35 |
| Quadro 7 – Detecção de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em suínos asselvajados | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| ABPA | Associação Brasileira de Proteína Animal |
| APPV | <i>Atypical porcine pestivirus</i> (Pestivírus atípico suíno) |
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IHQ | Imuno-histoquímica |
| IPP | Índice para pneumonia |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| Kb | Quilobase |
| OIE | Organização Mundial de Saúde Animal |
| ORF | Fase aberta de leitura |
| Mhyo | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> |
| Nm | Nanômetro |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PCV-1 | <i>Porcine circovirus 1</i> (Circovírus suíno 1) |
| PCV-2 | <i>Porcine circovirus 2</i> (Circovírus suíno 2) |
| PCV-3 | <i>Porcine circovirus 3</i> (Circovírus suíno 3) |
| PCV-4 | <i>Porcine circovirus 4</i> (Circovírus suíno 4) |
| PED | <i>Porcine epidemic diarrhea</i> (Diarreia epidêmica dos suínos) |
| PPV | <i>Porcine parvovirus</i> (Parvovírus suíno) |
| PSC | Peste suína clássica |
| PSA | Peste suína africana |
| PRRS | Porcine reproductive and respiratory syndrome (Síndrome reprodutiva e respiratória suína) |
| SDNS | Síndrome da dermatite e nefropatia suína |
| SMDS | Síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos |

SVA Senecavirus A

TTSuV Torque teno sus virus (Torque teno virus suíno)

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | Javali | 20 |
| 2.2 | Circovírus suíno | 21 |
| 2.2.1 | Classificação e características estruturais e moleculares do circovírus suíno | 21 |
| 2.2.2 | Epidemiologia e patogenia de circovírus em suínos | 24 |
| 2.2.3 | Circovírus suíno 3 em suínos domésticos | 27 |
| 2.2.4 | Circovírus suíno 3 em suínos asselvajados | 31 |
| 2.2.5 | Cepas de circovírus suíno 3 em suínos comerciais e asselvajados | 32 |
| 2.2.6 | Coinfecções com outros patógenos | 34 |
| 2.2.7 | Diagnóstico de circovírus de importância na suinocultura | 35 |
| 2.3 | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | 37 |
| 2.3.1 | Classificação e características estruturais do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | 37 |
| 2.3.2 | Epidemiologia do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em suínos | 38 |
| 2.3.3 | Diagnóstico de pneumonia enzoótica suína | 40 |
| 2.3.4 | Controle da pneumonia enzoótica | 43 |
| 2.3.5 | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em suínos asselvajados | 44 |
| 2.3.6 | Coinfecção com outros patógenos | 45 |
| 2.4 | Considerações finais | 47 |
| 3 | REFERÊNCIAS | 48 |
| 4 | HIPÓTESE | 61 |
| 5 | OBJETIVOS | 62 |
| 5.1 | OBJETIVO GERAL | 62 |
| 5.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 62 |
| 6 | ARTIGO A – FULL-LENGTH GENOMIC DNA SEQUENCE OF PORCINE CIRCOVIRUS 3 FIELD STRAINS IN FREE-LIVING WILD BOARS IN PARANÁ STATE, BRAZIL | 63 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 7 | ARTIGO B – MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN FREE-LIVING WILD BOARS IN PARANÁ, BRAZIL | 72 |
| 8 | CONCLUSÕES | 80 |
| | APÊNDICES | 81 |
| | APÊNDICE A – PCV-3 Sequências Genômicas | 82 |
| | ANEXOS | 85 |
| | ANEXO A – Aprovação no Comitê de ética | 86 |
| | ANEXO B – Protocolo de técnicas | 87 |
| | ANEXO C – <i>Software</i> | 93 |

82 O Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne
83 suína e possui rebanho com 2.017.645 de matrizes alojadas. Em 2019, produziu 3.983
84 milhões de toneladas de carne suína, exportou 750 mil toneladas e gerou receita de
85 US\$1.597 milhão (ABPA, 2020). A região Sul possui 49% das matrizes nacionais e foi
86 responsável por 68,7% e 94,2% dos abates e das exportações, respectivamente, de carne
87 suína (ABPA, 2020). O Paraná possui 15,4% das fêmeas alojadas, proporcionou 19,8%
88 dos abates e 15,9% da carne exportada em 2019 (ABPA, 2020), e a região dos Campos
89 Gerais/PR aloja 2,3% do rebanho de suínos do país (IBGE, 2020).

90 O setor suinícola possui relevância para a economia, com geração de
91 renda e empregos diretos e indiretos. Contudo, nos últimos anos, a suinocultura mundial
92 passa por desafios sanitários, os quais ocasionam perdas econômicas e redução dos
93 rebanhos. Dentre os surtos de doenças infecciosas, destaca-se a reemergência da peste
94 suína africana (PSA) na China (OIE, 2020). Na última década, outros patógenos
95 também foram responsáveis por perdas econômicas consideráveis no setor suinícola,
96 como a síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS) e a diarreia epidêmica suína
97 (PED), que ocasionaram prejuízos econômicos de US\$ 664 e 900 milhões,
98 respectivamente, aos Estados Unidos, o terceiro maior produtor mundial de suínos
99 (HOLTRAMP et al., 2013; PAARLBERG, 2014). Os eventos sanitários desequilibram
100 as relações econômicas entre os países, por tornar sanitariamente instável a nação onde
101 ocorreu o surto. Desta forma, é primordial que a suinocultura se mantenha com bom
102 *status* sanitário para evitar prejuízos econômicos que comprometam toda a cadeia
103 produtiva.

104 Até o momento, a suinocultura brasileira encontra-se livre de alguns
105 agentes virais que acometem o sistema de produção internacional, como os vírus
106 responsáveis pela PRRS, PSA e PED (OIE, 2020). Contudo, é um equívoco pensarmos
107 que a biossegurança de nosso sistema suinícola não seja passível de melhorias, visto
108 que alguns vírus emergiram no país nos últimos anos, como Senecavirus A (SVA)
109 (LEME et al., 2015), pestivírus atípico suíno (APPV) (POSSATI et al., 2018) e
110 circovírus suíno 3 (PCV-3) (TOCHETTO et al., 2018).

111 Os suínos domésticos podem compartilhar patógenos com os suínos
112 asselvajados (BARBOSA et al., 2016), sendo estes considerados risco sanitário para a
113 produção comercial de suínos. Os suínos asselvajados referem-se às diferentes formas

114 cariotípicas e fenotípicas possíveis do javali (SALVADOR & FERNANDEZ, 2014).
115 No Brasil não se sabe o real tamanho da população de suínos asselvajados (PEDROSA
116 et al., 2015) visto que houve soltura e escape de criações autorizadas de javalis,
117 predispondo à formação de híbridos com os suínos domésticos (SALVADOR &
118 FERNANDEZ, 2014). Na região dos Campos Gerais, Paraná, também há relatos de
119 suínos asselvajados (DEBERDT & SCHERER, 2007; PEDROSA et al., 2015), sendo os
120 mesmos considerados como principal grupo envolvido na degradação de lavouras e
121 predação à pecuária nesta região (SEWARD et al., 2004).

122 Pouco se sabe sobre o real *status* sanitário dos suínos asselvajados no
123 Brasil e o papel que esses animais podem desempenhar como reservatórios e/ou
124 disseminadores de doenças aos rebanhos de suínos comerciais. Até o presente momento,
125 não existe avaliação de patógenos de importância para a suinocultura nos suínos
126 asselvajados na região dos Campos Gerais. Desta forma, estudos sanitários nestes
127 animais contribui para a biossegurança da produção dessa importante região suinícola
128 paranaense.

130

131 2.1 JAVALI

132 O javali (*Sus scrofa* L., 1758) possui origem europeia e atualmente é
133 encontrado em todo mundo, exceto na Antártica (LOWE et al., 2000, WEHR, 2020),
134 sendo sua introdução nos diferentes países realizada pelo homem. A alta dispersão do
135 javali em diversos países se deu pela facilidade de adaptação desta espécie aos
136 diferentes ambientes e por ser capaz de reproduzir com outros suídeos, como o suíno
137 doméstico (*Sus scrofa domestica*) e gerar descendentes (MIRANDA & LUI, 2003).

138 Nos anos de 1996 e 1997, no Brasil, houve introdução intencional de javalis
139 importados provenientes do Canadá e Europa para criações nos estados do Rio Grande
140 do Sul e de São Paulo (DEBERDT & SCHERER, 2007). Contudo, posteriormente,
141 acredita-se que houve dispersão de javalis para outros estados brasileiros e atualmente
142 estão presentes em todos os biomas (SALVADOR & FERNANDEZ, 2014). No estado
143 do Paraná, há relatos de introdução do javali na década de 60, pela cidade de Palmeira,
144 sendo estes animais direcionados com a finalidade de reprodução (MOURA-BRITO &
145 PATROCÍNIO, 2006).

146 Desde a entrada dos javalis no Brasil, acredita-se que ocorreram soltura e
147 cruzamentos intencionais, direcionados pelo homem, entre esses animais e o suíno
148 doméstico, aumentando a população de javali e seus descendentes no território
149 brasileiro (MOURA-BRITO & PATROCÍNIO, 2006; SALVADOR & FERNANDEZ,
150 2014; PEDROSA et al., 2015). A capacidade de dispersão dos machos adultos é de 13,9
151 km, enquanto as fêmeas adultas se dispersam no máximo 6,0 km (COSTA et al., 2019).
152 Esta diferença se deve à maior busca por território e acasalamento por parte dos machos
153 (KEULING et al., 2018). Adicionalmente, os javalis e seus descendentes não
154 apresentam predadores naturais, degradam a vegetação nativa e a água de superfície
155 (CUSHMAN et al., 2004), são potenciais transmissores de zoonoses (FREDRIKSSON-
156 AHOMAA et al., 2019) e reservatórios de patógenos que acometem os suínos
157 domésticos (BARBOSA et al., 2016).

158 No Brasil, o javali puro ou em diferentes graus de cruzamento com o suíno
159 doméstico, gerando o suíno asselvajado, é considerado como espécie exótica invasora
160 (SALVADOR & FERNANDEZ, 2014). Em 2013, o Instituto Brasileiro do Meio
161 Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) declarou a espécie suína
162 asselvajada nociva, permitindo sua caça no Brasil. Concomitante à liberação do
163 IBAMA, a Embrapa Suínos e Aves iniciou o projeto de prevalência de peste suína
164 clássica (PSC) em suínos asselvajados em algumas regiões do Brasil.

165 Em relação à sanidade de suínos domésticos, em 2004, o Ministério da
166 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de
167 Sanidade Suídea (PNSS) que faz o controle sanitário oficial das granjas suinícolas a fim
168 de mitigar riscos de introdução de doenças exóticas e controlar e/ou erradicar as
169 doenças existentes no rebanho de suínos brasileiro. Devido aos riscos sanitários
170 representados pelos patógenos emergentes e reemergentes na suinocultura e a
171 capacidade dos suínos asselvajados serem reservatórios destes agentes, o
172 monitoramento sanitário de animais asselvajados em programas de vigilância é
173 importante para a detecção precoce das doenças que afetam os suínos de granjas
174 comerciais.

175 2.2 CIRCOVÍRUS SUÍNO

176 2.2.1 Classificação e características estruturais e moleculares do circovírus suíno

177 A família *Circoviridae* é composta por dois gêneros, *Cyclovirus* e
178 *Circovirus*, com 52 e 49 espécies virais, respectivamente. Ambos os gêneros possuem
179 espécies patogênicas para diferentes animais e o *Circovirus* compreende os Circovírus
180 dos suínos (*Porcine Circovirus* - PCV) (ROSARIO et al., 2017).

181 Inicialmente foram identificados em suínos PCV-1 (TISCHER et al.,
182 1974) e PCV-2 (TISCHER et al., 1986) e, recentemente, foram descritas mais duas
183 espécies, denominadas PCV-3 (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017) e PCV-4
184 (ZHANG et al., 2019).

185 PCV-1 é considerado não patogênico, PCV-2 é conhecido como
186 importante agente primário de doenças em suínos (SEGALÉS et al., 2012) e há relatos
187 de PCV-3 associado com diferentes manifestações clínicas (PALINSKI et al., 2017;

188 KIM et al., 2018b; BERA et al., 2019; CONTI et al., 2021). Por outro lado, até o
 189 momento, as informações sobre PCV-4 são limitadas e o vírus foi identificado somente
 190 em suínos na China que apresentavam problemas entéricos e respiratórios (ZHANG et
 191 al., 2019); porém, o seu potencial patogênico ainda não foi elucidado.

192 Estruturalmente, os circovírus apresentam capsídeo icosaédrico com
 193 60 moléculas de proteínas dispostas em 12 unidades pentaméricas, não possuem
 194 envelope e o genoma é constituído por DNA circular de fita simples (1.7-2.3 kb). Com
 195 diâmetro médio de 14-26 nm, são considerados os menores vírus DNA que infectam
 196 vertebrados (MENG, 2013; OUYANG et al., 2019).

197 O DNA de PCV-1, -2, -3 e -4 é constituído por 1.758-1.760, 1.766-
 198 1.769, 1.999-2.001 e 1.770 nucleotídeos (nt), respectivamente (MENG, 2013; PHAN et
 199 al., 2016; PALINSKI et al., 2017; ZHANG et al., 2019). O gênero *Circovirus* possui
 200 três principais sequências abertas de leitura (*Open reading frames* – ORFs) sendo
 201 denominadas ORF1, ORF2 e ORF3; todavia, até o momento, somente ORF1 e ORF2
 202 foram caracterizadas no PCV-3 e PCV-4 (Quadro 1).

203 **Quadro 1.** Características genômicas de circovírus suíno PCV-1, PCV-2, PCV-3 e
 204 PCV-4. Número de nucleotídeos (nt) do genoma viral e tamanho (aa) das proteínas
 205 codificadas a partir das três principais sequências abertas de leitura (ORF1, ORF2 e
 206 ORF3).

207

| Circovírus suíno | Tamanho do genoma completo (nt) | ORF1 | | ORF2 | | ORF3 | |
|------------------|---------------------------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|
| | | proteína | tamanho (aa) | proteína | tamanho (aa) | proteína | tamanho (aa) |
| PCV-1 | 1758-1760 | Rep | 312 | Cap | 230-233 | * | 206 |
| | | Rep' | 168 | | | | |
| PCV-2 | 1766-1769 | Rep | 314 | Cap | 233-236 | * | 104 |
| | | Rep' | 297 | | | | |
| PCV-3 | 1999-2001 | Rep | 296-297 | Cap | 214 | ** | 231 |
| PCV-4 | 1770 | Rep | 296 | Cap | 228 | ** | ** |

208

Nota: *Proteína não estrutural **Desconhecido.

209

Fonte: Meng et al., 2013; Phan et al., 2016; e Palinski et al., 2017; e Zhang et al., 2019.

210

211 A ORF1 encontra-se no sentido positivo da fita simples de DNA viral
 212 e codifica proteínas importantes para a replicação do material genético, enzimas
 213 replicase denominadas Rep e Rep' (MENG et al., 2013). A ORF2 está no sentido
 214 negativo (3'-5'), codifica a proteína do capsídeo e é considerada a região mais
 215 imunogênica do circovírus, visto que mutações no capsídeo podem alterar as interações
 216 vírus-hospedeiro (KARUPPANNAN et al., 2009). A ORF3 está no sentido positivo da
 217 fita e codifica uma proteína que induz a apoptose celular (HOUGH et al., 2015).

218 Os circovírus compartilham determinantes antigênicos comuns com
219 base em imunoenaios contra Rep, entretanto, a proteína do capsídeo é antigenicamente
220 distinta entre as espécies (ROSARIO et al., 2017). Os critérios para demarcação de
221 espécies no gênero *Circovirus* é de 80% da identidade de sequência de nucleotídeos de
222 todo o genoma com base na distribuição de identidades de pares (ROSARIO et al.,
223 2017).

224 A similaridade de aminoácidos (aa) das proteínas codificadas pela
225 ORF1 entre PCV-1 e PCV-2 é de 85%, entre PCV-1 e PCV-3 é de 95% e entre PCV-2 e
226 PCV-3 é de 48% (ALLAN & ELLIS, 2000; PHAN et al., 2016; PALINSKI et al.,
227 2017). A identidade de sequência de nt da ORF1 entre PCV-1 e PCV-2 é de 83%, e
228 entre PCV-2 e PCV-3 é de 48% (ALLAN & ELLIS, 2000; PHAN et al., 2016;
229 PALINSKI et al., 2017).

230 A similaridade de aminoácidos (aa) das proteínas codificadas pela
231 ORF2 entre PCV-1 e PCV-2 é de 66%, entre PCV-1 e PCV-3 é de 24% e entre PCV-2 e
232 PCV-3 é de 26% (ALLAN & ELLIS, 2000; PHAN et al., 2016; PALINSKI et al.,
233 2017). A identidade de sequência de nt da ORF2 entre PCV-1 e PCV-2 é de 67%, entre
234 PCV-1 e PCV-3 é de 24% e entre PCV-2 e PCV-3 é entre 26-36% (ALLAN & ELLIS,
235 2000; PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017).

236 A taxa de mutação do PCV-2 é maior que a esperada para vírus DNA
237 e, desde seu surgimento, novas variantes emergiram, sendo registradas oito genótipos
238 até o momento (a - h) (FRANZO et al., 2018). Estes genótipos se diferem pela variação
239 na ORF2, o que sugere divergentes graus na patogenicidade entre eles (FRANZO et al.,
240 2018). Os genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2d são os mais prevalentes no mundo
241 (FRANZO et al., 2018) e no Brasil (GAVA et al., 2017) e PCV-2b parece ser mais
242 patogênico que PCV-2a (CRUZ et al., 2018).

243 Em 2016, PCV-3 foi identificado pela primeira vez em amostras de
244 suínos nos Estados Unidos (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). Porém, estudos
245 retrospectivos detectaram o vírus em amostras referentes ao ano de 1993 na Suécia (YE
246 et al., 2018) e em 1996 na China e Espanha (KLAUMANN et al., 2018; SUN et al.,
247 2018). Inicialmente foram identificados três grupos, denominados PCV-3a, PCV-3b e
248 PCV-3c conforme características genéticas (FRANZO et al., 2018b; FUX et al., 2018),
249 porém não houve consenso entre os diferentes grupos de pesquisa quanto à classificação
250 dos genótipos (FRANZO et al., 2020), como ocorreu com PCV-2 (SEGALÉS et al.,
251 2008). Em 2020, foi sugerida uma nova classificação para PCV-3, com base na
252 distância genética entre genomas completos (máxima 3%) ou ORF2 (máxima 6%) das

253 cepas virais (FRANZO et al., 2020). Com isso, dois clados distintos foram definidos e
254 denominados clado 1 e clado 2. As sequências classificadas anteriormente como PCV3-
255 a e PCV3-c estão juntas no clado 1 e as sequências PCV3-b no clado 2 (FRANZO et al.,
256 2020). Até o momento há somente três sequências (MG372488; MG372490;
257 MT847026) disponíveis no GenBank do genótipo PCV3-b (clado 2), sendo todas
258 chinesas.

259 2.1.2. Epidemiologia e patogenia de circovírus em suínos

260 Circovírus suíno foi descrito pela primeira vez como contaminante de
261 cultivo de células renais suína (TISCHER et al., 1974) e, posteriormente, foi
262 identificado que o genoma do vírus é constituído por uma molécula de DNA fita
263 simples circular, originando o nome da família “*Circoviridae*” (TISCHER et al., 1986).
264 Com sua descoberta, PCV-1 foi inoculado em suínos saudáveis e não provocou sinais
265 clínicos, sendo considerado como não patogênico (TISCHER et al., 1986).

266 Em 1991, nova espécie de circovírus, denominada PCV-2, foi
267 identificada em associação com síndrome de refugagem de leitões desmamados
268 (ALLAN et al., 1998). Atualmente, PCV-2 é considerado endêmico na suinocultura
269 mundial e causa diversas doenças, como síndrome multissistêmica do definhamento dos
270 suínos (SMDS), síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS), pode estar
271 relacionado com quadros respiratórios e entéricos em suínos, e reprodutivos em
272 matrizes, com aumento na taxa de leitões natimortos e mumificados (ELLIS, 2014;
273 OUYANG et al., 2019). PCV-2 infecta tanto suínos domésticos em criações comerciais
274 quanto suínos asselvajados em cativeiro e de vida livre (SEGALÉS et al., 2012;
275 FRANZO et al., 2015).

276 Os sinais clínicos observados nas infecções por PCV-2 dependem da
277 síndrome presente, sendo que em casos de SMDS, por exemplo, emagrecimento
278 progressivo, anemia, anorexia, enterite, úlcera gástrica e linfadenomegalia generalizada
279 são os sinais clínicos identificados com maior frequência. Os casos de SMDS são mais
280 comuns em leitões com mais de três meses de idade e são observados sinais de
281 inapetência, áreas eritematosas na pele e edema subcutâneo (BERA et al., 2019). Javalis
282 também podem desenvolver a SMDS quando expostos aos fatores estressantes dos
283 confinamentos (ECCO et al., 2009; BARBOSA et al., 2016).

284 PCV-2 foi descrito no Brasil pela primeira vez em 1999 (CIACCI-
285 ZANELLA & MORÉS, 2003) e, deste então, é considerado endêmico no país e gera
286 perdas econômicas na produção de suínos brasileira (CIACCI-ZANELLA & MORÉS,
287 2003; HERDT et al., 2019). Contudo, estudos retrospectivos mostraram a presença de
288 PCV-2 em amostras biológicas de suínos arquivadas desde 1988 (CIACCI-ZANELLA
289 et al., 2006).

290 PCV-2 pode ser transmitido de forma horizontal e vertical, sendo as
291 que vias de transmissão mais comuns são a oronasal, entre a matriz e o leitão, e a
292 orofecal entre os leitões. PCV-2 pode ser excretado nas fezes por até 13 dias e apresenta
293 relativa estabilidade às condições ambientais, corroborando para alta disseminação viral
294 (GRAU-ROMA et al., 2008). O vírus também pode ser detectado por no mínimo 50
295 dias em sêmen de suínos inoculados experimentalmente (BLOMQVIST et al., 2011),
296 sendo que o macho infectado torna-se potencial transmissor de PCV-2 para a fêmea e
297 sua leitegada (GAVA et al., 2008). Ademais, matrizes inseminadas com sêmen
298 contaminado com PCV-2 podem apresentar falhas reprodutivas, como mumificados e
299 morte embrionária, e os nascidos vivos podem estar infectados com o vírus (SARLI et
300 al., 2012).

301 PCV-2 não codifica seu próprio DNA, sendo necessárias células na
302 fase S, em divisão ativa, para que o vírus complete seu ciclo infeccioso (TISCHER et
303 al., 1986). Há pouca informação sobre células alvo para replicação viral inicial, porém,
304 estudos relatam tropismo do vírus pelo sistema imunológico e que linfócitos T
305 circulantes (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (IgM⁺) são alvo de replicação viral (GRAU-
306 ROMA et al., 2009; SEGALÉS et al., 2012). O vírus se replica no linfonodo proximal à
307 infecção e pode se disseminar de forma sistêmica (Figura 1). A viremia de PCV-2
308 ocorre em torno de sete dias após a infecção (DPI) e atinge o pico com 14-21 DPI
309 (OPRIESSNIG et al., 2007).

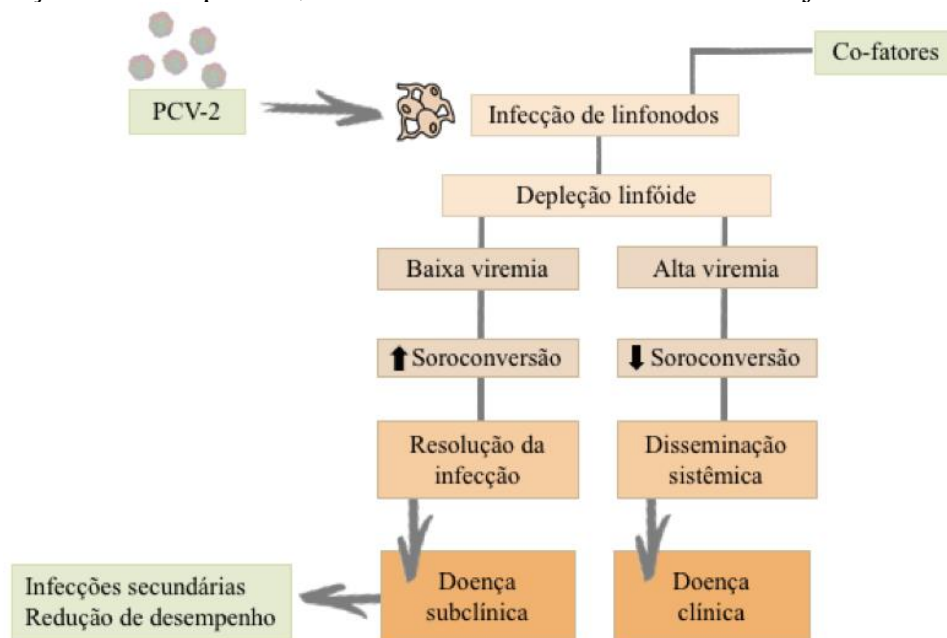
310 PCV-2 pode ocasionar depleção do sistema imunológico, tornando o
311 suíno incapaz de responder de forma efetiva à doença ou mesmo susceptível a outros
312 patógenos (SEGALÉS et al., 2012). Alguns animais podem apresentar infecção
313 subclínica devido baixa viremia e lesões teciduais ocasionadas por PCV-2 podem não
314 ser observadas em órgãos não linfoides; todavia, nestes casos, os animais podem ficar
315 susceptíveis aos patógenos secundários e apresentarem baixo desempenho produtivo.

316 A interação vírus-hospedeiro e a intensidade dos sinais clínicos
317 dependem de elementos intrínsecos ao leitão, à leitegada e ao ambiente (OPRIESSNIG
318 et al., 2007; BARCELLOS et al., 2008). A herança genética e a capacidade imunológica

319 são condições individuais e o efeito leitegada refere-se ao estado da matriz lactante, que
320 pode transmitir o vírus à leitegada e também transferir anticorpos protetivos via
321 colostro.

322 O ambiente é representado pelo efeito dos manejos realizados com os
323 suínos (zootécnico, sanitário e nutricional). Os elementos de manejo configuram os
324 fatores que diminuem a homeostase da interação suíno-ambiente-vírus, como ausência
325 de conforto térmico, disputa por alimento e/ou espaço, medo, mistura de diferentes
326 lotes, escuridão ou excesso de luminosidade, alta ou baixa umidades, baixa qualidade do
327 ar, água não potável, processos inadequados de limpeza e desinfecção, entre outros
328 (OPRIESSNIG et al., 2007; BARCELLOS et al., 2008).

329 **Figura 1** - Patogenia da infecção por circovírus suíno 2 (PCV-2). PCV-2 replica em
330 órgão linfóide proximal à infecção e ocasiona depleção linfóide. Em baixa viremia
331 ocorre resolução da infecção e em alta viremia ocorre a disseminação sistêmica do
332 vírus. O prognóstico clínico é influenciado por fatores predisponentes que influenciam
333 na interação vírus-hospedeiro, como os fatores individuais e de manejo.



Fonte: o próprio autor.

334

335 Devido à imunossupressão ocasionada por PCV-2, infecções mistas
336 podem ocorrer, sendo comum observar associação com agentes primários, como
337 *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) ou agentes secundários como *Glaesserella*
338 *parasuis* e *Streptococcus suis*. Em síndromes reprodutivas, pode-se observar a presença
339 de infecções mistas de PCV-2 com parvovírus suíno (PPV) ou leptospiras patogênicas,
340 ocasionando aumento na taxa de fetos mumificados e de natimortos (HERDT et al.,
341 2019).

342 2.2.3 Circovirus suíno 3 em suínos domésticos

343 Pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção por PCV-3 em
344 suínos, todavia há relatos de transmissão do vírus por fluidos oral, nasal e fezes que
345 evidenciam a transmissão horizontal (KWON et al., 2017; FRANZO et al., 2018b;
346 COLLINS et al., 2017; KLAUMANN et al., 2019b), em colostro (KEDKOVID et al.,
347 2018) e sêmen (KU et al., 2017), sugerindo transmissão vertical. Desta forma, acredita-
348 se que PCV-3 possua semelhança epidemiológica com PCV-2.

349 Em suínos comerciais, PCV-3 tem sido associado a quadros clínicos
350 reprodutivos (FACCINI et al., 2017; KU et al., 2017; PALINSKI et al., 2017; KIM et
351 al., 2018b; TOCHETTO et al., 2018; ZOU et al., 2018; DEIM et al., 2019),
352 dermatopatias (PHAN et al., 2016; SUKMAK et al., 2019; BERA et al., 2019)
353 inflamação multissistêmica (PHAN et al., 2016; ARRUDA et al., 2019; WILLIAMSON
354 et al., 2019; CONTI et al., 2021), distúrbios neurológicos (PHAN et al., 2016; CHEN et
355 al., 2017) e respiratórios (PHAN et al., 2016; SUKMAK et al., 2019; CHEN et al.,
356 2017; ZHAI et al., 2017; FUX et al., 2018; KEDKOVID et al., 2018; KIM et al., 2018b).

357 Os estudos disponíveis com detecção de PCV-3 em suínos comerciais,
358 de acordo com sistema fisiológico acometido, fase de produção estão apresentados no
359 Quadro 2.

360 **Quadro 2** – Detecção de circovírus suíno 3 em suínos comerciais de acordo com o
 361 sistema fisiológico e fase de produção.
 362

| Sistema fisiológico | Fase de produção [†] | Sinais clínicos observados | Referência |
|---------------------|---|---|--|
| Cardiovascular | Lactação e Terminação * | Anorexia, artrites, miocardite, refugagem | Phan et al., 2016 Arruda et al., 2019 Williamson et al., 2019 De Condi et al., 2021 |
| Tegumentar | Lactação | Dermatopatias | Phan et al., 2016 Sukmak et al., 2019 |
| Neurológico | Lactação | Sinais neurológicos, tremor congênito | Phan et al., 2016 Chen et al., 2017 |
| Reprodutivo | Gestação | Aborto, mumificados, natimortos | Faccini et al., 2017 Ku et al., 2017 Palinksi et al., 2017 Kim et al., 2018b Tochetto et al., 2018 Zou et al., 2018 Deim et al., 2019 |
| Respiratório | Lactação Creche Terminação * | Anorexia, dispneia, pirexia | Phan et al., 2016 Sukmak et al., 2019 Chen et al., 2017 Zhai et al., 2017 Phan et al., 2016 Fux et al., 2018 Kedkovid et al., 2018 Kim et al., 2018b De Condi et al., 2021 |
| Sistêmico | Lactação e Terminação * | Inflamação sistêmica | Stadejek et al., 2017 Arruda et al., 2019 Franzo et al., 2019 Williamson et al., 2019 De Condi et al., 2021 |

363 [†]Lactação: leitões de 0-24 dias de vida; Creche: leitões de 25-70 dias de vida; Terminação: leitões de 71-
 364 160 dias de vida; Gestação: matrizes de 0-110 dias gestacionais. * não informado pelos autores.
 365

366 Os estudos disponíveis no Quadro 2 mencionam a presença de PCV-3
 367 em suínos doentes e, de acordo com os autores, o vírus foi considerado como agente
 368 etiológico que ocasionou os sintomas clínicos observados. Destes, os únicos que
 369 descartaram outros patógenos como possíveis causadores das lesões e sinais clínicos
 370 observados nos suínos foram as pesquisas pioneiras na detecção de PCV-3 (PHAN et
 371 al., 2016; PALINSKI et al., 2017) e que usaram a hibridação *in situ* para detecção de

372 PCV-3 em lesões teciduais (PHAN et al., 2016; ARRUDA et al., 2019; De CONDI et
373 al., 2021).

374 No estudo de Williamson et al. (2019) PCV-3 foi encontrado em
375 grandes quantidades com auxílio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em
376 natimortos e leitões com tremor congênito e, de acordo com os autores, o vírus foi
377 relacionado com o quadro clínico observado, todavia, outros patógenos não foram
378 pesquisados. Ademais, a maioria destas investigações de PCV-3 em suínos nos
379 diferentes estudos não utilizou grupo controle negativo, ou somente estão sustentados
380 pela detecção de PCV-3 pela PCR em amostras de soro ou tecido, não utilizaram
381 hibridação *in situ* para detecção de PCV-3 em lesões teciduais e também não avaliaram
382 a presença de outros patógenos como PCV-2.

383 PCV-3 foi detectado em taxas que variam de 6,7% - 97,0% em suínos
384 com algum sinal clínico e taxas entre 6,8% - 34,5% em suínos saudáveis (Quadro 3).
385 Porém, a detecção em animais contemporâneos saudáveis foi de 29,8% enquanto
386 animais com sintomas respiratórios foi 17,9% e ambos os grupos apresentaram a mesma
387 carga viral em amostras coletadas entre 1997 e 2018 (SAPORITI et al., 2020).

388 **Quadro 3.** Detecção de circovírus suíno 3 em suínos comerciais em países da Europa,
 389 Ásia e América do Sul com ou sem sinal clínico.
 390

| País | Sinais clínicos (sistema fisiológico) | Amostra analisada | Taxa de detecção | Referência |
|---------------|--|--------------------------|-------------------------|--|
| Itália | Sem sinais | Pulmão | 34,5% (10/29) | Franzo et al., 2018b |
| | Sem sinais | Soro | 18,1% (6/33) | |
| | Sem sinais | Suabe | 12,5% (1/8) | |
| | Sem sinais | Diferentes órgãos | 6,8% (20/29) | |
| Dinamarca | Respiratório | Linfonodo | 94,7% (36/38) | Franzo et al., 2018b |
| | Respiratório | Pulmão | 10,0% (2/20) | |
| | Respiratório | Soro | 30,0% (6/20) | |
| Espanha | Sem sinais | Soro | 14,8% (14/94) | Franzo et al., 2018b Saporiti et al., 2020 Saporiti et al., 2020 Saporiti et al., 2020 Saporiti et al., 2021 |
| | Sem sinais | Soro | 6,7% (4/60) | |
| | Respiratório | Soro | 6,2% (8/129) | |
| | Digestivo | Soro | 5,6% (7/126) | |
| | Reprodutivo | Feto | 33,9% (18/53) | |
| Tailândia | Respiratório | Soro e tecidos | 36,7% (29/79) | Sukmak et al., 2019 |
| Coréia do Sul | Respiratório | Diferentes órgãos | 9,8% (6/58) | Kim et al., 2018b |
| | Reprodutivo | Feto | 21,4% (3/14) | |
| Japão | Respiratório | Diferentes órgãos | 10,3% (7/73) | Hayashi et al, 2018 |
| | Reprodutivo | Feto | 6,7% (1/15) | |
| Brasil | Reprodutivo | Feto | 14,6% (26/178) | Rodrigues et al., 2020 |
| | Respiratório | Linfonodo/Pulmão | 47,8% (32 /67) | Saraiva et al., 2019 |
| | Reprodutivo | Fetos | 97,0% (270/276) | Dal santo et al., 2020 |
| | Respiratório | Soro | 26,7% (41/154) | Cruz et al., 2020 |
| EUA | Respiratório | Coração | 95,2% (20/21) | De Condi et al., 2021 |
| | Refugagem Entérico | Pulmão | 85,7% (18/21) | De Condi et al., 2021 |
| | | Linfonodo | 83,3% (5/6) | De Condi et al., 2021 |
| | | Baço | 83,3% (10/12) | De Condi et al., 2021 |
| | | Fígado | 81,8% (9/11) | De Condi et al., 2021 |

391 No estudo brasileiro, de caráter retrospectivo, PCV-3 foi identificado
 392 em diferentes amostras de tecidos coletadas entre 2006 e 2010 em nove estados
 393 brasileiros, sendo as taxas de detecção de 50% (1/2) em Goiás, 80% (4/5) no Mato
 394 Grosso, 100% (1/1) no Mato Grosso do Sul, 34% (15/44) em Minas Gerais, 100% (2/2)
 395 no Espírito Santo, 67% (2/3) em São Paulo, 100% (2/2) no Paraná, 100% (2/2) em
 396 Santa Catarina e 100% (3/3) no Rio Grande do Sul (SARAIVA et al., 2019). Todavia, a
 397 amostragem avaliada na maioria dos estados foi pequena podendo ocorrer viés na
 398 interpretação da prevalência. Em outra pesquisa, PCV-3 foi detectado em 26,7%
 399 (41/154) das amostras de soro de suínos com sinais clínicos respiratórios, e de acordo

400 com os autores, o vírus poderia estar associado ao quadro clínico dos animais (CRUZ et
401 al., 2020).

402 Em relação às perdas reprodutivas, a detecção de PCV-3 em feto suíno
403 foi de 6,7 - 97% (HAYASHI et al., 2018; KIM et al., 2018b; DAL SANTO et al., 2020;
404 RODRIGUES et al., 2020). Esta variação pode ser devido a alguns estudos não
405 investigarem outros patógenos que possam ocasionar perdas reprodutivas (HAYASHI et
406 al., 2018; CRUZ et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020), enquanto outros autores
407 detectarem a co-infecção com PPV ou PCV-2 ou leptospiros patogênicas em 93,1% das
408 amostras positivas para PCV-3 (DAL SANTO et al., 2020). Contudo, estes resultados se
409 baseiam apenas pela detecção do vírus por PCR e não deixam claro o seu envolvimento
410 no quadro clínico reprodutivo.

411 Apesar da detecção de PCV-3 ser associada com diferentes casos
412 clínicos em suínos em todo mundo, as lesões histológicas ocasionadas pelo vírus
413 precisam ser melhor elucidadas. Recentemente, nos Estados Unidos, De Condi et al.
414 (2021) associaram lesões histopatológicas com PCV-3 com auxílio da hibridização *in*
415 *situ* de suínos que apresentavam refugagem, diarreia e dispnéia. Nesta investigação, o
416 órgão com maior taxa de detecção de PCV-3 foi o coração (95,2%, 20/21), sendo
417 associada à miocardite linfoplasmocitária, seguido pelo pulmão (85,7%, 18/21) com
418 pneumonia intersticial linfoplasmocitária.

419 Suínos podem permanecer por longos períodos infectados pelo PCV-3
420 de forma subclínica (KLAUMANN et al., 2019a), sugerindo comportamento
421 semelhante ao PCV-2. Todavia, estudos adicionais precisam ser conduzidos para
422 elucidar a dinâmica de PCV-3 e sua associação com o desenvolvimento de doenças em
423 suínos.

424 2.2.4 Circovírus suíno 3 em suínos asselvajados

425 A taxa de detecção de PCV-3 em suínos asselvajados são semelhantes
426 ou superiores às taxas de infecção em suínos comerciais e variam de 9,1% a 57,1%
427 (KLAUMANN et al., 2019), possivelmente devido às pesquisas serem realizadas em
428 amostras biológicas provenientes de diferentes órgãos e regiões geográficas. Os estudos
429 realizados em suínos asselvajados ainda são escassos, conforme apresentado no Quadro
430 4.

431 **Quadro 4.** Detecção de circovírus suíno 3 em suínos asselvajados por meio da técnica
432 de PCR.

| País | Ano | Amostra | Prevalência | Referência |
|----------|-----------|------------|-----------------|------------------------|
| Alemanha | 2011-2015 | Baço | 29,2% (26/89) | Prinz et al., 2019 |
| Espanha | 2004-2018 | Soro | 42,6% (221/518) | Klaumann et al., 2019b |
| Espanha | 2017 | Soro | 52,6% (10/19) | Klaumann et al., 2019b |
| Espanha | 2004-2018 | Baço | 54,3% (19/ 35) | Klaumann et al., 2019b |
| | | Fezes | 9,1% (3/33) | |
| | | Fígado | 54,2% (19/35) | |
| | | Linfonodo | 30,0% (9/30) | |
| | | Pulmão | 57,1% (20/35) | |
| | | Tonsila | 42,8% (15/35) | |
| | | Soro | 17,8% (5/28) | |
| Itália | 2014-2015 | Soro | 30,0% (56/187) | Franzo et al., 2018c |
| Brasil | 2013-2015 | Linfonodos | 36,3% (29/80) | Varela et al., 2020 |

433

434 Em granjas comerciais de suínos, diferentes estudos mostram menor
435 prevalência de animais PCV-3 positivos na categoria de leitões lactente comparado aos
436 leitões de creche ou terminação (KWOW et al., 2017; STADEJEK et al., 2017; FUX et
437 al., 2018). As taxas de infecção em suínos asselvajados jovens e adultos foi de 8,6%
438 (2/23) e 47,5% (152/320), respectivamente (KLAUMANN et al., 2019), sugerindo
439 seguir a mesma tendência observada em suínos domésticos. Todavia, em suínos
440 asselvajados ainda é difícil determinar a real prevalência por faixa etária devido aos
441 escassos estudos e dificuldade em se obter amostras biológicas de animais de diferentes
442 idades.

443 Atualmente, não há evidências de que PCV-3 ocasione doença em suínos
444 asselvajados, no entanto, estudos realizados sugerem que eles sejam susceptíveis e
445 atuem como potenciais reservatórios do vírus.

446

447 2.2.5 Cepas de circovírus suíno 3 em suínos comerciais e asselvajados

448 Além dos estudos de prevalência, há na literatura sequências
449 genômicas parciais e completas de PCV-3 detectadas em suínos comerciais e
450 asselvajados, sendo algumas destas disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*).
451 Neste banco de dados, existem poucas sequências catalogadas de dados de genoma
452 completo de PCV-3 em suínos domésticos no Brasil e de cepas provenientes de suínos
453 asselvajados de todo mundo. No Quadro 5 são apresentados os números de acesso

454 (*GenBank*) destas sequências, o ano de coleta, e amostra biológica em que PCV-3 foi
455 identificado.

456

457 **Quadro 5** – Sequências de genoma completo de circovírus suíno 3 identificadas em
458 suínos domésticos brasileiros e em asselvajados de todo mundo disponíveis[†] no
459 *GenBank*.

| Sequências de genoma completo de PCV-3 | | | | |
|--|-------------------|----------|------------------|-------------------------|
| País | Espécie | Ano | Número de acesso | Amostra biológica |
| Brasil | Suíno comercial | 2016 | MF079253 | Soro |
| | | 2016 | MF079254 | Soro |
| | | 2018 | MK645715 | Feto |
| | | 2018 | MK645716 | Feto |
| | | 2018 | MK645717 | Feto |
| | | 2018 | MK645718 | Feto |
| | 2018 | MK645719 | Feto | |
| | Suíno asselvajado | 2018 | MH699985 | Linfonodo retrofaríngeo |
| Espanha | Suíno asselvajado | 2005 | MH579736 | Soro |
| | | 2018 | MH579747 | Soro |
| Alemanha | | 2018 | MK820624 | Pulmão |

460 [†] Acesso ao *Genbank* em 21 de dezembro de 2020.

461 As sequências de PCV-3 MF079253 e MF079254 são provenientes de
462 amostras de soro coletadas em 2016 de matrizes comerciais após parto com leitegadas
463 compostas por alta incidência de natimortos e com baixo número de nascidos em
464 granjas no estado do Rio Grande do Sul (TOCHETTO et al., 2018). As sequências de
465 PCV-3 MK645715, MK645717, MK645718 e MK645719 são de amostras de fetos
466 provenientes de granjas de suínos dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina,
467 Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, coletadas em 2018 (DAL SANTO et al., 2020).
468 Ambos os estudos realizados no Brasil, de acordo com os autores, associam o PCV-3
469 com perdas reprodutivas observadas nos animais amostrados.

470 Recente estudo realizado por Varela et al. (2020) detectou PCV-3 em *pool* de
471 linfonodo retrofaríngeo de suínos asselvajados manejados no estado do Rio Grande do
472 Sul, sendo a primeira cepa de PCV-3, nestes animais e no Brasil, catalogada no
473 *Genbank* (número de acesso: MH699985).

474 Os estudos pioneiros no mundo na detecção de PCV-3 em suínos
475 asselvajados ocorreram na Europa, com a primeira detecção em amostra de pulmão de
476 animal manejado na Alemanha em 2018 (número de acesso: MH699985).
477 Posteriormente, estudo retrospectivo realizado na Espanha detectou cepas de PCV-3

478 (número de acesso: MH579736; MH579747) em soro de suínos asselvajados
479 amostrados entre os anos de 2005 e 2018 (KLAUMANN et al., 2019b).

480 As sequências de PCV-3 recuperadas de suínos asselvajados possuem
481 em torno de 98% de identidade de nt com as cepas identificadas em suínos domésticos
482 disponíveis no GenBank (KLAUMANN et al., 2018). As sequências de PCV-3
483 disponíveis possuem 94,4 a 100% de identidade de nt e 96,3 a 100% de similaridade de
484 aa entre si (HAYASHI et al., 2018; QI et al., 2019; SARAIVA et al., 2019; SUKMAK
485 et al., 2019). Estudos retrospectivos demonstram que não ocorreu agrupamento
486 geográfico e migração temporal, sugerindo estabilidade genética de PCV-3 na
487 população suína mundial (SUN et al., 2018).

488

489 2.2.6 Coinfecções com outros patógenos

490 É comum observar coinfecção entre PCV-2 e outros microrganismos,
491 como influenza suína (OUYANG et al., 2019), *Torque teno sus virus* (TTSuV)
492 (ROGERS et al., 2017) e PPV (SAEKHOW et al., 2016). De forma similar ao PCV-2,
493 há relatos da presença de PCV-3 e outros agentes em mesma amostra, sugerindo quadro
494 coinfeccioso (Quadro 6).

495 **Quadro 6.** Detecção de circovírus suíno 3 em coinfeccção com outros agentes etiológicos
 496 em suínos.
 497

| Patógenos | Taxa de coinfeccção (%) | Referência |
|---------------------|-------------------------|-------------------------------|
| PCV-3 + PCV-2 | 28,2 (13/46) | Kim et al., 2018 ^a |
| | 2,0 (3/150) | Chen et al., 2019 |
| | 39,3 (52/ 132) | Zheng et al., 2017 |
| | 1,2 (2/159) | Chen et al., 2019 |
| | 27,6 (94/340) | Zheng et al., 2018 |
| | 6,8 (18/265) | Zheng et al., 2018 |
| | 15,2 (16/105) | Ha et al., 2018 |
| | 5,4 (18/336) | Wang et al., 2019 |
| | 22,3 (17/76) | Fu et al., 2018 |
| | 17,9 (12/67) | Saraiva et al., 2019 |
| | 12,5 (2/16) | Prinz et al., 2019 |
| | 7,5 (3/40) | Prinz et al., 2019 |
| | 61,5 (8/13) | Sukmak et al., 2019 |
| PCV-3+PCV-2+PCV-1 | 6,2 (1/16) | Prinz et al., 2019 |
| | 2,5 (1/40) | Prinz et al., 2019 |
| PCV-3+PRRSV | 0,7 (1/150) | Chen et al., 2019 |
| | 3,8 (4/105) | Han et al., 2019 |
| | 61,5 (8/13) | Sukmak et al., 2019 |
| PCV-3+PCV-2+PRRSV | 0,6 (1/150) | Chen et al., 2019 |
| | 0,6 (1/159) | Chen et al., 2019 |
| | 30,7 (4/13) | Sukmak et al., 2019 |
| PCV-3+PEDV | 27,2 (18/66) | Han et al., 2019 |
| PCV-3+PPV2 | 8,6 (9/105) | Ha et al., 2018 |
| PCV-3+PPV6 | 20,0 (21/105) | Ha et al., 2018 |
| PCV-3+PPV7 | 24,8 (26/105) | Ha et al., 2018 |
| PCV-3+TTSuV1 | 83,3 (110/132) | Zheng et al., 2018 |
| PCV-3+TTSuV2 | 11,4 (12/105) | Ha et al., 2018 |
| | 71,2 (94/132) | Zheng et al., 2018 |
| PCV-3+TTSuV1+TTSuV2 | 50,0 (66/132) | Zheng et al., 2018 |

498 2.2.7 Diagnóstico de circovírus de importância na suinocultura

499 Devido ao PCV-2 se associar facilmente a outras doenças, o exame
 500 clínico dos animais em conjunto ao laboratorial é de suma importância para o
 501 diagnóstico (OPRIESSNIG et al., 2007; BARCELLOS et al., 2008).

502 Leitões na fase de creche são mais susceptíveis à refugagem
 503 (OPRIESSNIG et al., 2007) devido à mescla de animais de diferentes leitegadas para a
 504 formação de lotes mais homogêneos, o que favorece a transmissão do vírus entre os

505 leitões pela via oronasal. Nestes casos, os métodos de diagnóstico mais eficazes são a
506 detecção de achados histológicos sugestivos de PCV-2, como depleção linfocitária com
507 inflamação granulomatosa, ou a detecção de antígenos do vírus em linfonodos por meio
508 da imuno-histoquímica (IHQ) (GRAU-ROMA et al., 2009; SEGALÉS et al., 2012).

509 Em casos de suspeita de síndrome reprodutiva ocasionada por PCV-2,
510 amostras de fetos natimortos e mumificados são importantes para o diagnóstico com
511 auxílio da PCR associada à IHQ (HERDT et al., 2019). Fetos mumificados e/ou
512 natimortos positivos na PCR associadas às perdas reprodutivas podem indicar o
513 envolvimento de PCV-2 na doença. Contudo, é importante avaliar o sinergismo de
514 PCV-2 com outros agentes etiológicos que ocasionam falhas na reprodução (HERDT et
515 al., 2019).

516 Em relação ao PCV-3, pouco se sabe sobre a dinâmica de infecção e
517 técnicas sensíveis de diagnóstico. Todavia, PCV-3 foi identificado em diversos tecidos
518 (baço, cérebro, colostro, coração, fetos mumificados e/ou natimortos), fluidos (fluidos
519 oral, nasal e peritoneal), fezes, sêmen e soro com auxílio da técnica de PCR (CHEN et
520 al., 2017; COLLINS et al., 2017; KU et al., 2017; KWON et al., 2017; FRANZO et al,
521 2018a, KIM et al., 2018b; TOCHETTO et al., 2018), e em coração, pulmão, fígado,
522 baço e linfonodos pela hibridização *in situ* (PHAN et al., 2016; ARRUDA et al., 2017;
523 De CONDI et al., 2021).

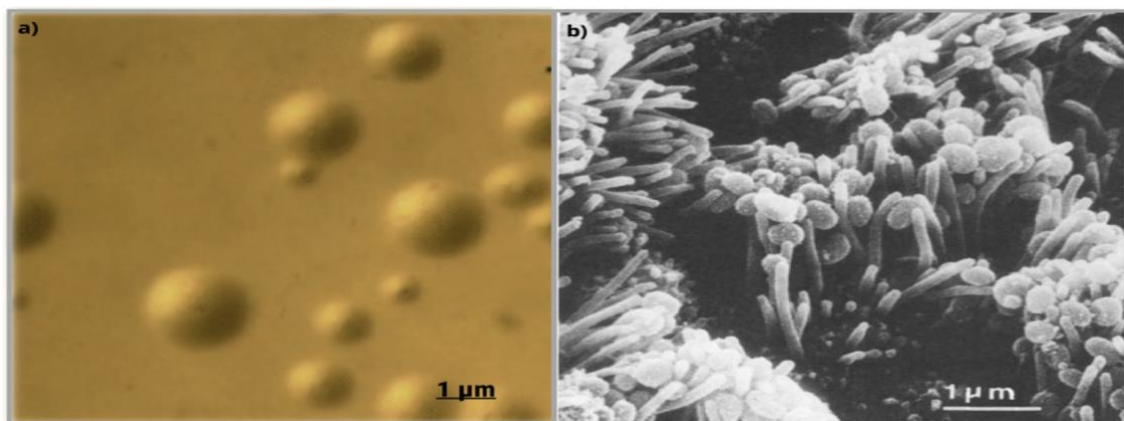
524 Em suínos asselvajados, PCV-3 foi identificado com auxílio da PCR
525 em amostras de soro (FRANZO et al., 2018c) e tecidos (FRANZO et al., 2018c; PRINZ
526 et al., 2019; VARELA et al., 2020).

528 2.3.1 Classificação e características estruturais do *Mycoplasma hyopneumoniae*

529 O gênero *Mycoplasma* é composto por mais de 120 espécies e são
530 patógenos capazes de infectar animais, humanos e vegetais (COOK et al., 2016;
531 WEISBROTH & KOHN, 2020). Os micoplasmas identificados como capazes de
532 ocasionar doença em suínos são o *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), *Mycoplasma*
533 *hyosynoviae* e *Mycoplasma hyorhinis* (SIQUEIRA et al., 2013). Todavia, outros
534 isolados, como *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma arginini*,
535 *Mycoplasma hyopharyngis*, e *Mycoplasma mycoides* foram identificados em suínos e
536 até o momento não apresentam importância sanitária elucidada (SIQUEIRA et al.,
537 2013).

538 Os micoplasmas são bactérias anaeróbias, pleomórficas e,
539 estruturalmente, caracterizadas por não possuírem parede celular. Formam colônias
540 dispersas e pequenas sendo consideradas as menores bactérias, com apenas 200 nm de
541 diâmetro (Figura 2) e genoma de 580 – 2200 kb (COOK et al., 2016; GARCIA-
542 MORANTE et al., 2017; WEISBROTH & KOHN, 2020).

543 **Figura 2** – a) Colônias de *Mycoplasma hyopneumoniae* em meio seletivo para este
544 agente. b) Microscopia eletrônica de *Mycoplasma hyopneumoniae* em cílios traqueais
545 suínos.



546 **Fonte:** Cook et al. (2016) e Blanchard et al. (1992).

547

548

549 Os micoplasmas necessitam de meios seletivos para crescerem e
550 possuem períodos de incubação longos, sendo considerados microrganismos fastidiosos,
551 por demorarem semanas a meses para crescerem em laboratório (PANTOJA et al.,

551 2016; MICHIELS et al., 2017; PIETERS & MAES, 2019). Devido ao seu genoma
552 pequeno, estes microrganismos possuem metabolismo reduzido e não apresentam
553 algumas vias enzimáticas que são importantes, sendo considerados parasitas
554 obrigatórios (PIETERS & MAES, 2019).

555 Variantes de Mhyo podem apresentar diferenças genéticas, antigênicas
556 (BALESTRIN et al., 2019) e de patogenicidade (WOOLLEY et al., 2014). O mesmo
557 animal pode ser infectado simultaneamente por mais de uma variante de Mhyo
558 (MICHIELS et al., 2017) e quanto mais variantes presentes em um rebanho, maior a
559 taxa de pulmões com algum grau de lesão de pneumonia e maior a extensão destas
560 lesões por pulmão (PANTOJA et al., 2016; MICHIELS et al., 2017).

561
562 2.2.2 Epidemiologia do *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos.

563
564
565 O micoplasma foi descrito pela primeira vez em 1898, em pulmão de
566 bovinos com pleuropneumonia (WEISBROTH & KOHN, 2020). Posteriormente, outros
567 patógenos morfológicamente semelhantes foram identificados em diversos hospedeiros,
568 sendo estes microrganismos classificados como *Pleuropneumonia-like organisms*
569 (WEISBROTH & KOHN, 2020).

570 O Mhyo foi descrito por Maré & Switzer (1965) e, posteriormente,
571 Goodwin et al. (1968) reproduziram a pneumonia enzoótica de forma experimental.
572 Desde então, o Mhyo é considerado o agente etiológico da pneumonia enzoótica (PE)
573 em suínos. Esta doença ocorre em diversos países e possui prevalência de 95% em
574 granjas de suínos no Brasil (TAKEUTI et al., 2013).

575 A PE é considerada a doença do complexo respiratório suíno mais
576 importante na produção suinícola mundial (MAES et al., 2017; PIETERS & MAES,
577 2019) e brasileira (MORÉS et al., 2015). A doença pode gerar incremento de 1,39% na
578 mortalidade de leitões terminados e aumento de US\$ 0,61 por suíno com tratamento
579 (SILVA et al., 2019) e custo adicional de US\$ 0,63 a 10,41 por suíno (HADEN et al.,
580 2012). Animais acometidos pela doença podem apresentar tosse, dispneia, atraso no
581 crescimento e inapetência (MAES et al., 2017).

582 Dos animais abatidos em frigoríficos brasileiros, 73,9% apresentaram
583 lesões macroscópicas em pulmões sugestivas de PE (GALDEANO et al., 2019). Em
584 outro estudo, houve a confirmação por IHQ da presença do Mhyo em 74% das
585 pneumonias observadas, ratificando a importância deste agente como patógeno
586 respiratório primário na suinocultura brasileira (MORÉS et al., 2015).

587 As matrizes suínas desempenham importante papel na epidemiologia
588 da doença, principalmente as leiteiras, que excretam com maior frequência o Mhyo após
589 o parto (BRANDALISE et al., 2019), tornando a transmissão vertical relevante na
590 disseminação deste patógeno no rebanho. Desta forma, se espera que ao desmame
591 tenham grupos de leitões infectados pela mãe e grupos negativos, que não foram
592 expostos ao agente.

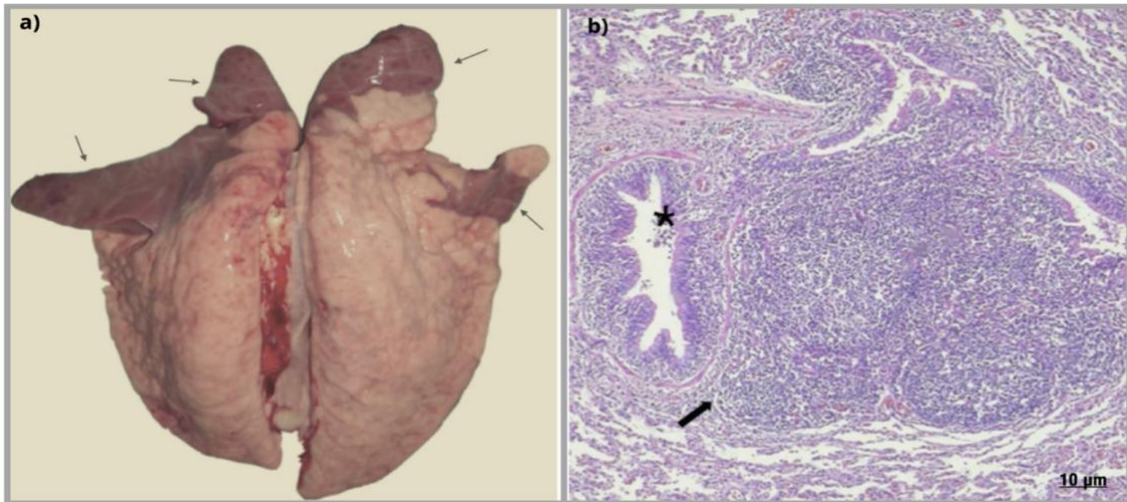
593 Ao desmame, frequentemente, há mistura de animais de diferentes
594 leitegadas na mesma baia de creche e, com esse manejo, suínos infectados podem ser
595 alojados com animais não infectados. Com isso, pode ocorrer a transmissão horizontal
596 entre os suínos (SPONHEIM et al., 2019), o que contribui para a disseminação do
597 agente nos lotes de animais nas fases subsequentes.

598 Após a infecção, o período de tempo necessário para a soroconversão
599 pode variar de 7 a 21 dias e o aparecimento de lesões pulmonares pode ocorrer 14 dias
600 pós-infecção com cicatrização em 30 a 70 dias (PIETERS et al., 2009; DOS SANTOS
601 et al., 2012). A PE é considerada uma doença crônica (PIETERS & MAES, 2019) e o
602 Mhyo pode ser excretado por até 214 dias (PIETERS et al., 2009). Desta forma, em
603 rebanhos com alta prevalência de matrizes excretando Mhyo durante o período de parto,
604 é possível ter grupos de leitões infectados ao desmame, antes mesmo de receberem a
605 vacina para este agente.

606 O Mhyo tem tropismo pelo sistema respiratório, se adere ao epitélio
607 das vias aéreas e ocasiona cilioestase, perda de cílios e morte celular (PANTOJA et al.,
608 2016; MICHIELS et al., 2017). Conseqüentemente, o sistema mucociliar irá apresentar
609 menor eficiência, o que facilita a entrada do próprio Mhyo e de patógenos secundários
610 (DOS SANTOS et al., 2012; PIETERS & MAES, 2019) que podem ocasionar lesões no
611 parênquima pulmonar. Adicionalmente, o Mhyo altera a expressão de lipoproteínas
612 superficiais na membrana celular contribuindo para sua evasão do sistema imune
613 (PIETERS & MAES, 2019). No processo infeccioso há grande produção de citocinas
614 pró-inflamatórias no tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), ocasionando
615 infiltração de células mononucleares na região perivascular e peribrônquica (GARCIA-
616 MORANTE et al., 2016) (Figura 3a). Conseqüentemente, ocorrem lesões atelectásicas e
617 focais no pulmão que são sugestivas de PE (Figura 3b).

618

619 **Figura 3.** Pulmão suíno. **a)** Hepatização pulmonar focal (seta) sugestiva de pneumonia
620 enzoótica (posição dorsal). **b)** Hiperplasia do tecido linfoide peribronquiolar (seta),
621 infiltrado inflamatório no lúmen bronquiolar e nos alvéolos adjacentes (*), HE.
622

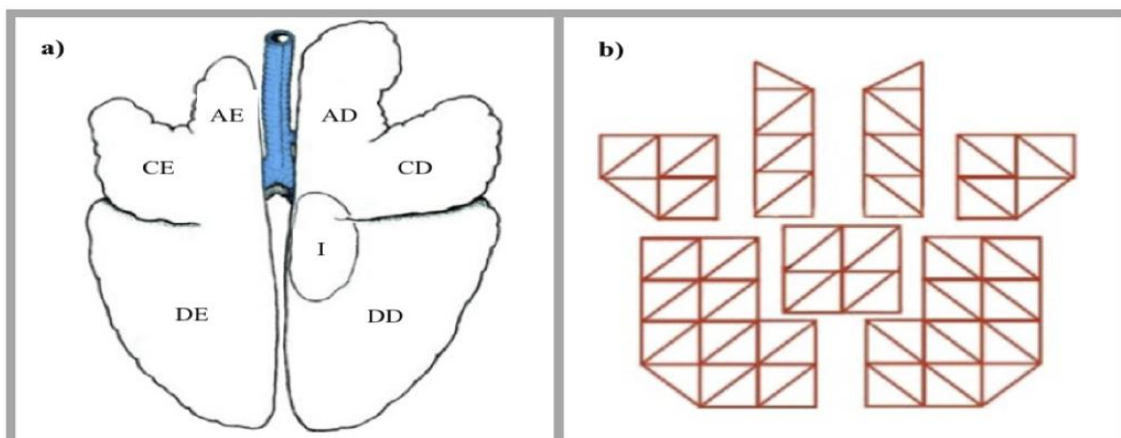


623
624 **Fonte:** o próprio autor.

625 2.2.3 Diagnóstico de pneumonia enzoótica suína

626 As lesões macroscópicas em pulmões encontradas em suínos com PE
627 podem ser classificadas conforme a sua extensão por lobo pulmonar (GARCIA-
628 MORANTE et al., 2016; PIETERS & MAES, 2019). O pulmão suíno possui sete lobos
629 pulmonares (Figura 4a) com dimensões diferentes entre eles (Figura 4b) e o índice total
630 de lesão pulmonar é calculado pela observação da extensão da hepatização de cada lobo.
631

632 **Figura 4** – Pulmão suíno. a) Desenho esquemático em posição dorsal, apresentando os
633 sete lobos pulmonares. b) representação esquemática de cada lobo pulmonar, com
634 destaque para as diferentes dimensões entre eles.
635



636 Lobos: AE – Apical esquerdo; CE – Cardíaco esquerdo; DE – Diafragmático esquerdo; DD –
637 Diafragmático direito; CD – Cardíaco direito; DD – Diafragmático direito; I – intermediário.
638 **Fonte:** Adaptado de Hannan et al. (19982) e Garcia-Morante et al. (2016)
639

640 Em seguida, o cálculo do índice para pneumonia (IPP) observados é
641 mensurado dividindo o índice total de hepatização pelo número de animais
642 examinados no lote:

643

$$644 \quad \boxed{IPP = \frac{\text{índice total}}{n^{\circ} \text{ de pulmões examinados}}}$$

645

646 Pelo IPP é possível interpretar como a PE se encontra no lote dos
647 animais cujos pulmões foram avaliados. Esta interpretação considera:

648

1) $IPP \leq 0,55$: rebanhos considerados livres de Mhyo.

649

2) $IPP \geq 0,56$: rebanhos em que a pneumonia está presente, porém sem importância
650 sanitária. Contudo, é preciso considerar os fatores ambientais para que não se
651 tenha evolução de índice.

652

3) $IPP \geq 0,90$: rebanhos com ocorrência elevada de PE.

653

(SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2012)

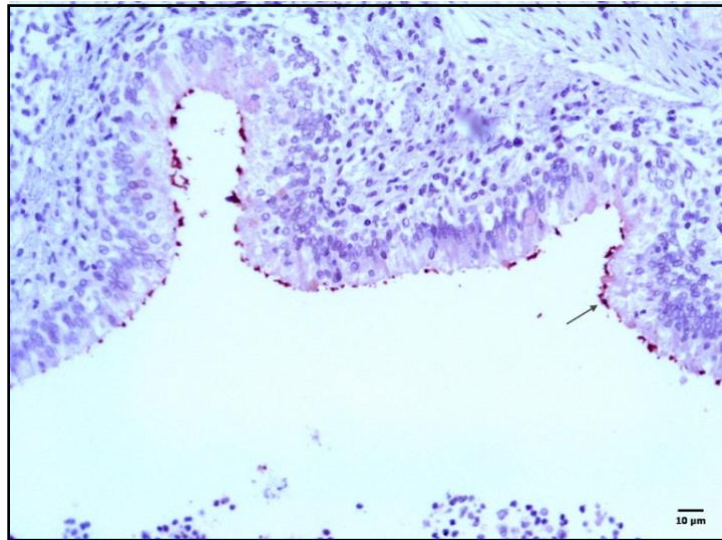
654

A avaliação do pulmão pela observação da presença de lesões focais
655 de hepatização não é patognomônica, porém, pulmões com estas lesões é considerada
656 sugestiva de PE (PIETERS & MAES, 2019). É esperado que pulmões com estas lesões
657 macroscópicas possuam 1370 vezes mais chances de ter lesões microscópicas
658 ocasionadas por Mhyo (CARRIJO et al., 2014). Todos os pulmões avaliados por Carrijo
659 et al. (2014), que apresentaram lesão macroscópica sugestiva de Mhyo, possuíam lesões
660 microscópicas condizentes com este agente, revelando alta associação entre
661 macroscopia e microscopia.

662

A IHQ é empregada na rotina de diagnóstico de PE (GARCIA-
663 MORANTE et al., 2016) por revelar a presença do Mhyo nas lesões microscópicas
664 (Figura 5), confirmando a atuação deste patógeno no quadro de pneumonia. Pulmões
665 com lesões macroscópicas sugestivas de PE possuem 2,25 vezes mais chances de
666 detecção de Mhyo por IHQ quando comparados com pulmões sem lesão macroscópica.
667 Pulmões positivos na IHQ possuem 96,75 vezes mais chances de terem lesões
668 pulmonares microscópicas (CARRIJO et al., 2014).

669 **Figura 5.** Imuno-histoquímica para detecção de antígeno de *Mycoplasma*
670 *hyopneumoniae* em células epiteliais brônquicas de javali (ponta da seta). 10 µm.
671



672
673 **Fonte:** o próprio autor

674
675 A pesquisa de anticorpos para Mhyo também pode ser empregada
676 como diagnóstico para PE (PETERSEN et al., 2016; PIETERS & MAES, 2019).
677 Contudo, em rebanhos vacinados não é possível diferenciar anticorpos vacinais
678 daqueles provenientes do contato com o patógeno em infecção natural (PIETERS &
679 MAES, 2019). Desta forma, a sorologia é comumente utilizada para monitoria de
680 rebanhos livres e para controle da pneumonia em reprodutores, uma vez que somente as
681 leitoas são habitualmente vacinadas.

682 A técnica de PCR possui alta sensibilidade e especificidade na
683 detecção de Mhyo (PIETERS & MAES, 2019) e pode ser realizada para a identificação
684 deste agente em amostras de suabe de laringe (BRANDALISE et al., 2019) ou traqueia
685 (SPONHEIM et al., 2019) em fêmeas no pós-parto e para a monitoria de rebanhos livres
686 de PE.

687 Mhyo cresce lentamente em culturas (PIETERS & MAES, 2019)
688 tornando o isolamento difícil de ser realizado na rotina de diagnóstico. Desta forma, a
689 identificação da PE em suínos é realizada pela observação de sinais clínicos no rebanho
690 associado às lesões pulmonares macroscópicas e microscópicas sugestivas de Mhyo,
691 sendo estas comprovadas pela IHQ de tecido pulmonar.

692 2.2.4 Controle da pneumonia enzoótica

693

694 A vacinação para Mhyo é considerada eficaz para o controle da PE
695 diminuindo a ocorrência de sinais clínicos e o grau de lesões pulmonares. Porém, a
696 vacinação não impede a infecção pelo agente de campo e sua colonização no sistema
697 respiratório do suíno (PIETERS & SIBILA, 2017).

698 Rotineiramente, os leitões são vacinados ao desmame, com 21 dias de
699 idade, e espera-se que duas semanas após a vacinação, estes animais tenham imunidade
700 contra Mhyo e que esta perdure em média por até 130 dias (PIETERS & MAES, 2019).

701 A proteção colostrar para Mhyo é composta por imunoglobulinas e
702 células do sistema imune e para ser efetiva é importante que o leitão receba o colostro
703 de sua mãe biológica (PIETERS & SIBILA, 2017). Desta forma, é preciso ter cautela
704 nos manejos de retirada de leitões da leitegada nas primeiras 24 horas de vida.

705 A imunidade colostrar é importante para que se tenha estabilidade
706 sanitária do plantel. Em granjas com plantel reprodutivo estabilizado, ou seja, com
707 poucas matrizes excretando Mhyo ao parto, associado à efetiva ingestão de colostro
708 pelo leitão é esperada baixa circulação deste patógeno nos leitões desmamados
709 (BRANDALISE et al., 2019).

710 Além da transmissão vertical e do contato direto focinho-focinho entre
711 leitões, o Mhyo pode ser transmitido com facilidade pelo ar, podendo ocasionar
712 infecção em rebanhos distantes em até 9,2 km (OTAKE et al., 2010), ademais, a
713 transmissão pelo ar é importante nos processos de aclimatação de leitoas para Mhyo
714 (BRANDALISE et al., 2019).

715 Aconselha-se que as leitoas de reposição ao serem introduzidas no
716 plantel sejam vacinação para Mhyo e estejam próximas às leitoas introduzidas de lotes
717 anteriores, para que ocorra a exposição controlada do Mhyo pelo ar, o que contribui
718 para correta aclimatação de leitoas. Neste processo, pode ocorrer o compartilhamento de
719 variantes de Mhyo entre as leitoas, recém e anteriormente introduzidas, sugerindo que
720 leitoas recém-chegadas também podem infectar às demais leitoas do galpão com novas
721 variantes. Nestes casos, as leitoas mais velhas poderão estar susceptíveis ao Mhyo
722 próximo ao momento de inseminação, contribuindo para aumento da taxa de anestro
723 neste grupo de animais (BRANDALISE et al., 2019). Desta forma, conhecer o *status*
724 sanitário das leitoas adquiridas antes de sua introdução na granja contribui para o
725 controle sanitário do plantel reprodutivo.

726 Estudos norte-americanos demonstraram que são necessárias seis
 727 leitoas positivas para infectar uma leitoa negativa (PIETERS et al., 2009). Por outro
 728 lado, recentemente, no Brasil, foi constatado que somente uma leitoa positiva é capaz de
 729 infectar seis leitoas negativas, sugerindo que a dinâmica de infecção de Mhyo seja
 730 diferente nos diversos sistemas de produção e/ou que as variantes de Mhyo possam
 731 apresentar taxas de disseminação desiguais (BRANDALISE et al., 2019).

732 Para granjas com insucesso no controle da PE, sugere-se os protocolos
 733 de erradicação, visto que rebanhos livres são economicamente viáveis (SILVA et al.,
 734 2019). O Mhyo permanece de forma persistente no sistema respiratório do suíno,
 735 dificultando a sua erradicação no rebanho, mesmo em protocolos que incluem o uso de
 736 medicamentos (HOLST et al., 2015), sugerindo que protocolos de despovoamento
 737 possam ser mais eficazes na erradicação de Mhyo em granjas.

738

739 2.2.5 *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos asselvajados

740

741 Diferentemente da literatura sobre PE em suínos comerciais, há
 742 poucos estudos de taxas de infecção de Mhyo em suínos asselvajados (Quadro 7).

743 **Quadro 7.** Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos asselvajados.

| País | Ano | Amostra biológica | Técnica | Taxa de detecção (%) | Referência |
|-----------|------|-------------------|-----------|----------------------|-----------------------------|
| Eslovênia | 2006 | Soro | Sorologia | 21,0 (38/178) | Vengust et al., 2006 |
| | 2014 | Soro | Sorologia | 15,8(29/184) | Stukelj et al., 2014 |
| França | 2006 | Soro | Sorologia | 58,0 (53/91) | Marois et., 2006 |
| Espanha | | Soro | Sorologia | 21,0 (92/428) | Sibila et al., 2010 |
| | | Pulmão | PCR | 8,0 (12/156) | Sibila et al., 2010 |
| | 2010 | Suabe nasal | PCR | 20,0 (17/85) | Sibila et al., 2010 |
| | 2011 | Soro | Sorologia | 26,6 (71/267) | Closa-Sebastia et al., 2011 |
| | 2014 | Soro | Sorologia | 13,9 (23/165) | Risco et al., 2104 |
| Rússia | 2009 | Soro | Sorologia | 52,0 (51/98) | Kukushkin et al., 2009 |
| Itália | 2014 | Soro | Sorologia | 30,0 (655/2177) | Chiari et al., 2014 |
| Brasil | 2020 | Soro | Sorologia | 19,7 (12/61) | Severo et al., 2020 |

744 A taxa de infecção para Mhyo varia de 8,0% a 58,0% em suínos
 745 asselvajados em todo mundo (MAROIS et al., 2006; SIBILA et al., 2010), sendo
 746 observada detecção em 65% (286/439) de animais jovens e 26% (264/1013) em adultos
 747 (MAROIS et al., 2006). Entretanto, os dados são escassos devido a dificuldade em se
 748 obter amostras biológicas destes animais, incluso por faixa etária.

749 Os estudos com estes animais são, em sua maioria, com a investigação
750 de anticorpos para Mhyo em amostra de soro (MAROIS et al., 2006; VENGUST et al.,
751 2006; KUKUSHKIN et al., 2009; CLOSA-SEBASTIA et al., 2011). Por outro lado,
752 Mhyo também foi detectado com auxílio de PCR em amostras de pulmão e fluidos
753 nasais (SIBILA et al., 2010) e pulmões de suínos asselvajados apresentaram lesões
754 macroscópicas e microscópicas sugestivas de PE (CHIARI et al., 2014).

755 A taxa de detecção de anticorpos para Mhyo foi de 19,7% (12/61) em
756 suínos asselvajados manejados em Santa Catarina nos anos de 2017 e 2018 (SEVERO
757 et al., 2020), todavia, neste estudo não foi realizado teste confirmatório para este
758 patógeno. Em outra pesquisa no Brasil, javalis de criatório comercial apresentaram
759 pulmões com lesões macroscópicas e microscópicas sugestivas de Mhyo e sinais
760 clínicos de PE semelhantes aos observados em suínos comerciais, como: tosse, dispneia,
761 inapetência e redução no ganho de peso (ECCO et al., 2009).

762 Os poucos estudos revelam que os suínos asselvajados são
763 susceptíveis ao Mhyo, com variada taxa de infecção e que estes animais podem
764 desenvolver lesões pulmonares de PE, sugerindo que outros fatores podem ser
765 importantes para que a doença clínica seja expressa nestes animais.

766

767 2.2.6 Coinfecção com outros patógenos

768

769 Mhyo é um importante patógeno primário do complexo de doenças
770 respiratórias em suínos e por ocasionar lesões no sistema respiratório, predispõe o suíno
771 às infecções por outros agentes primários, como os vírus da influenza (DEBLANC et
772 al., 2012; DEBLANC et al., 2016) e PCV-2 (FABLET et al., 2012), e também por
773 agentes secundários comensais do trato respiratório, como *Pasteurella multocida*
774 (TAKEUTI et al., 2013) e *Glaesserella parasuis* (KIM et al., 2002; CAI et al., 2005).

775 A taxa de coinfecção de Mhyo com H1N1 é em torno de 31,0%
776 (DEBLANC et al., 2012; DEBLANC et al., 2016; RECH et al., 2018) e leitões positivos
777 para Mhyo coinfectados com H1N1 apresentaram lesões pulmonares mais intensas e
778 menor desempenho produtivo quando comparados aos leitões contemporâneos
779 infectados pelo vírus e que não eram portadores de Mhyo (DEBLANC et al., 2012).
780 Mesmo comportamento de sinergismo se observou em coinfecção de Mhyo com PCV-2
781 (FABLET et al., 2012) sendo que a taxa de coinfecção entre ambos é de 33,6% a 35,5%
782 (PALLARES et al., 2002; FABLET et al., 2012).

783 Os sinais clínicos nos suínos acometidos por H1N1 ou PCV-2 são
784 exacerbados com a coinfeção prévia com Mhyo (DEBLANC et al., 2012) devido ao
785 aumento da resposta inflamatória ocasionada primariamente pelo Mhyo (DEBLANC et
786 al., 2016). Todavia, a coinfeção simultânea de Mhyo com H1N1 ou com PCV-2 parece
787 não potencializar os sinais clínicos ou lesões pulmonares de ambos vírus (YAZAWA et
788 al., 2004; SIBILA et al., 2012).

789 As lesões pulmonares de suínos ocasionadas por *Pasteurella*
790 *multocida* ou por *G. parasuis* podem ser exacerbadas em infecção prévia por Mhyo
791 (KIM et al., 2002; CAI et al., 2005; KICH et al., 2010; LIU et al., 2017), contribuindo
792 para aumento de condenas ao abate em decorrência de pleurite e pneumonia (KICH et
793 al., 2010; LIU et al., 2017). Em suínos, a taxa de coinfeção de Mhyo com *Pasteurella*
794 *multocida* é de 97,6% (TAKEUTI et al., 2013) e com *Glaesserella parasuis* de 19,2% a
795 24,2% (KIM et al., 2002; CAI et al., 2005).

797 A condição sanitária da suinocultura é essencial para que se mantenha
798 as relações econômicas do setor e contribui para o crescimento da produção de suínos
799 em todo mundo. Contudo, nos últimos anos, o surgimento de novos patógenos
800 ocasionou grandes perdas na suinocultura mundial.

801 A suinocultura brasileira contribui de forma consistente para o
802 Produto Interno Bruto brasileiro e possui melhor *status* sanitário comparado aos outros
803 grandes produtores de suínos, como China e Estados Unidos. Porém, a vigilância
804 epidemiológica é fundamental para manter esta boa condição de saúde do rebanho suíno
805 nacional.

806 Conhecer a prevalência de microrganismos emergentes, como o PCV-
807 3, e endêmicos como o Mhyo, um dos mais importantes patógenos da suinocultura,
808 contribuem para entender o perfil sanitário da produção.

809 Os suínos asselvajados podem ser reservatórios de várias classes de
810 microrganismos de apresentação endêmica, epidêmica, além de emergentes e
811 reemergentes e, conseqüentemente, podem transmiti-los aos planteis de suínos
812 domésticos. Com isto, a investigação epidemiológica realizada em suínos asselvajados é
813 importante para se conhecer e quantificar o potencial risco sanitário destes animais à
814 suinocultura comercial brasileira.

815 Associado aos estudos de prevalência, a biologia molecular é
816 importante ferramenta para entendermos a epidemiologia clássica e molecular das
817 infecções, bem como a distribuição espacial dos patógenos, particularmente nas regiões
818 geográficas com maior concentração de criações comerciais de suínos domésticos.

819 O conhecimento técnico gerado pela investigação sanitária em suínos
820 asselvajados permite a elaboração de programas sanitários específicos e a orientação de
821 técnicos, produtores e trabalhadores rurais direcionadas à melhoria da biossegurança
822 das granjas comerciais de suínos.

823 REFERÊNCIAS

- 824 ABPA Brazilian Association of Animal Protein. Annual report, 2020. Disponível
825 online:[http://abpabr.org/wpcontent/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portug](http://abpabr.org/wpcontent/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portuguese_web.pdf)
826 [uese_web.pdf](http://abpabr.org/wpcontent/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portuguese_web.pdf). Acessado 18/05/2020.
- 827 ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E.G.; ELLIS,
828 J.A.; HAINES, D.M.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Isolation of porcine circovirus-
829 like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of**
830 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10(3), p. 3-10, 1998.
- 831
832 ALLAN, G. M.; ELLIS J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary**
833 **Diagnostic and Investigation**, v. 12, p. 3 - 4, 2000.
- 834 ARRUDA, B.; PIÑEYRO, P.; DERSCHIED, R.; HAUSE, B.; BYERS, E.; DION, K.;
835 LONG, D.; SIEVERS, C.; TANGEN, J.; WILLIAMS, T.; SCHWARTZ, K.; PCV3-
836 associated disease in the United States swine herd. **Emerging Microbes and**
837 **Infections**, v. 8(1), p. 684-698, 2019.
- 838 BALESTRIN, E.; KUHNERT, P.; WOLF, J.M.; WOLF, L.M.; FONSECA, A.S.K.;
839 IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; SIQUEIRA, F.M. Clonality of *Mycoplasma*
840 *hyopneumoniae* in swine farms from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 238, p. 1-14,
841 2019.
- 842 BARBOSA, C. N.; MARTINS, N. R. S.; FREITAS, T. R. P.; LOBATO, Z. I. P.
843 Serological Survey of *Porcine circovirus-2* in Captive Wild Boars (*Sus scrofa*) from
844 Registered Farms of South and South-east Regions of Brazil. **Transboundary and**
845 **Emerging Diseases**, v. 63, p. 278–280, 2016.
- 846 BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; GHELLER, N. B.; MÔNICA SANTI,
847 M.; MORES, T. J. Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos.
848 **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p.87- 93, 2008.
- 849 BERA, B.C.; CHOUDHARY, M.; ANAND, T.; VIRMANI, N.; SUNDARAM, K.;
850 CHOUDHARY, B.; TRIPATHI BN. Detection and genetic characterization of *Porcine*
851 *circovirus 3 (PCV-3)* in pigs in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.
852 67(3), p. 1062-1067, 2020.
- 853 BETLACH, A.M.; MAES, D.; GARZA-MORENO, L.; TAMIOZZO, P.; SIBILA, M.;
854 HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J.; PIETERS, M. *Mycoplasma hyopneumoniae*
855 variability: Current trends and proposed terminology for genomic classification.
856 **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66(5), p. 1840-1854, 2019.
- 857 BLANCHARD, B.; VENA, M.M.; CAVALIER, A.; LANNIE, J.L.;GOURANTON, J.;
858 KOBISCH, M. Electron microscopic observation of respiratory tract of SPF piglets
859 inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 329-
860 341, 1992.

- 861 BLOMQUIST, G.; M. PERSSON; M. WALLGREN; P. WALLGREN; J. M.
862 MORRELL. Removal of virus from boar semen spiked with *Porcine circovirus type 2*.
863 **Animal Reproduction Science**, v.126(1-2), p. 108-114, 2011.
- 864 BRANDALISE, L.; DEZEN, D.; KICH, J. D.; TAKEUTI, K. L.; CLAVIJO.M. J.;
865 SIMÃO, G. M.R. NAGAE, R.; SATO, J. P H.; PIGOZZO, R. Dynamics of
866 *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in negative replacement gilts for the agent.
867 **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.17(Supl 1), p. 197-198, 2019.
- 868 CAI, X.; CHEN, H.; BLACKALL, P.J; YIN, Z.; WANG, L.; LIU, Z.; JIN, M.
869 Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. **Veterinary**
870 **Microbiology**, v. 20, p. 231-6, 2005.
- 871
872 CARRIJO, K. F.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V.L.A.; MORÉS, N.; KLEIN,
873 C.S. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela inspeção sanitária *post-mortem*:
874 comparação com outros métodos de diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina**
875 **Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 36, n.2, p. 188- 194, 2014.
- 876 CHEN, G.H.; MAI, K.J.; ZHOU, L.; WU, R.T.; TANG, X.Y.; WU, J.L.; HE, L.L.;
877 LAN, T.; XIE, Q.M.; SUN, Y.; MA, J.Y. Detection and genome sequencing of *Porcine*
878 *circovirus 3* in neonatal pigs with congenital tremors in South China. **Transboundary**
879 **and Emerging Diseases**, v. 64(6), p.1650-1654, 2017.
- 880 CHEN, N.; HUANG, Y.; YE, M.; LI, S.; XIAO, Y.; CUI, B.; ZHU, J. Co-infection
881 status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory
882 syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV-2 and PCV-3) in eight regions
883 of China from 2016 to 2018. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 68, p.127-135,
884 2019.
- 885
886 CHIARI, M.; FERRARI, N.; ZANONI, M.; ALBORALI, L. *Mycoplasma*
887 *hyopneumoniae* temporal trends of infection and pathological effects in wild boar
888 populations. **European Journal of Wildlife Research**. V. 60, p. 187–192, 2014.
- 889
890 CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic
891 wasting syndrome in pigs in Brazil caused by *Porcine circovirus type 2*. **Arquivo**
892 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.522-527, 2003.
- 893 CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.D.; GAVA, D.
894 Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por
895 imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**,
896 v. 36, p. 1480–1485, 2006.
- 897 COLLINS, P.J.; MCKILLEN, J.; ALLAN, G. *Porcine circovirus type 3* in the
898 UK. **Veterinary Record**, v. 181, p. 599, 2017.
- 899 COOK, B. S.; BEDDOW, J. G.; MANSO-SILVÁN, L.; MAGLENNON, G.A.;
900 RYCROFT, A. N. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*,
901 **Veterinary Microbiology**, v.195, p.158-164, 2016.
- 902 COSTA, E.F.; SCNEIDER, S.; CARLOTTO, T.C.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, M. R.
903 Zero-inflated-censored Weibull and gamma regression models to estimate wild boar
904 population dispersal distance. **Japanese Journal of Statistics and Data Science**,
905 v. 66(1), p. 91–101, 2019.

- 906 CROWTHER, R.A.; BERRIMAN, J.A.; CURRAN, W.L.; ALLAN, G.M.; TODD,
907 D. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: chicken anemia virus, *Porcine*
908 *circovirus type 2*, and beak and feather disease virus. **Journal of Virology**, v. 77, p.
909 13036-41, 2003.
- 910 CRUZ, T.F.; MAGROB, A.J.; DE CASTRO, A.M.M.G.; PEDRAZA-ORDOÑEZE,
911 F.J.; TSUNEMIF, M.; PERAHIAG, D.; ARAÚJO, J.R.J.P. In vitro and in silico studies
912 reveal capsid-mutant Porcine circovirus 2b with novel cytopathogenic and structural
913 characteristics. **Virus Research**, v. 251, p.22-33, 2018.
914
- 915 CUSHMAN, J. H.; TIERNEY, T.A.; HINDS, J.M. Variable effects of feral pigs
916 disturbances on native and toxic plants in a California grassland. **Ecological**
917 **Applications**. v.14, p. 1746-1756, 2004.
- 918 DAL SANTO, A.C.; CEZARIO, K.C.; BENNEMANN, P.E.; MACHADO, S.A.;
919 MARTINS, M. Full-genome sequences of *Porcine circovirus 3* (PCV-3) and high
920 prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. **Microbial**
921 **Pathogens**, v. 141, p. 1-5, 2020.
- 922 De Conti, E.R.; Resende, T.P.; Marshall-Lund, L.; Rovira, A.; Vannucci, F.A.
923 Histological Lesions and Replication Sites of PCV3 in Naturally Infected
924 Pigs. **Animals**, v. 11, p. 1520-1528, 2021.
925
- 926 DEIM, Z.; DENCŐ, L.; ERDÉLYI, I.; VALAPPIL, S.K.; VARGA, C.; PÓSA, A.;
927 MAKRAI, L.; RÁKHELY, G. *Porcine circovirus type 3* detection in a Hungarian pig
928 farm experiencing reproductive failures. **Veterinary Record**, v. 185(3), p. 84, 2019.
- 929 DEBERDT, A. J., SCHERER, S. B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da
930 espécie no Brasil. **Natureza e Conservação**, v. 5(2), p. 31-44, 2007.
- 931 DEBLANC, C.; GORIN S.; QUÉGUINER, S.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.V.;
932 FERRÉ, S.; AMENNA, N.; CARIOLET, R.; SIMON, G. Pre-infection of pigs with
933 *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine
934 influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. **Veterinary Microbiology**, v.157,
935 p. 96-105, 2012.
- 936 DEBLANC, C.; DELGADO-ORTEGA, M.; GORIN, S.; BERRI, M.; PABOEUF, F.;
937 BERTHON, P.; HERRLER, G.; MEURENS, F.; SIMON, G. *Mycoplasma*
938 *hyopneumoniae* does not affect the interferon-related anti-viral response but
939 predisposes the pig to a higher level of inflammation following swine influenza
940 virus infection. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 2501- 2515, 2016.
- 941 DOS SANTOS, J.L. Micoplasmoses. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S.
942 N. **Doenças dos Suínos**. 2º ed. Goiânia: Cãnone editorial, 2012. p. 889–892.
- 943 ECCO, R.; LAZZARI, A.M.; GUEDES, R.M.C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus*
944 *scrofa*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. [online], v.29, n.6, p.461- 468, 2009.
- 945 ELLIS J. Porcine circovirus: a historical perspective. **Veterinary Pathology**, v51(2), p.
946 315-27, 2004.

- 947 FACCINI, S.; BARBIERI, I.; GILIOLI, A.; SALA, G.; GIBELLI, L.R.; MORENO, A.;
 948 SACCHI, C.; ROSIGNOLI, C.; FRANZINI, G.; NIGRELLI, A. Detection and genetic
 949 characterization of *Porcine circovirus type 3* in Italy. **Transboundary Emerging**
 950 **Diseases**, v. 64, p. 1661–1664, 2017.
- 951 FRANZO, G.; CORTEY, M.; CASTRO, A.M.M.G. DE; PIOVEZAN, U.; SZABO,
 952 M.P.J.; DRIGO, M.; SEGALÉS, J.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic characterisation of
 953 *Porcine circovirus type 2* (PCV-2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An
 954 opportunity to reconstruct the history of PCV-2 evolution. **Veterinary Microbiology**,
 955 v.178, p. 158–162, 2015.
- 956 FRANZO, G.; SEGALÉS, J. *Porcine circovirus 2* (PCV-2) genotype update and
 957 proposal of a new genotyping methodology. **PLoS One**, v.13(12), p. 1-12, 2018a.
- 958 FRANZO, G.; LEGNARDI, M.; HJULSAGER, C.K.; KLAUMANN, F.; LARSEN,
 959 L.E.; SEGALÉS, J.; DRIGO, M. Full-genome sequencing of *Porcine circovirus 3* field
 960 strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic
 961 heterogeneity. **Transboundary Emerging Diseases**, v.65, p. 602–606, 2018b.
- 962 FRANZO, G.; TUCCIARONE, C.M.; DRIGO, M.; CECCHINATO, M.; MARTINI,
 963 M.; MONDIN, A.; MENANDRO, M.L. First report of wild boar susceptibility to
 964 *Porcine circovirus type 3*: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in
 965 the absence of clinical signs. **Transboundary Emerging Diseases**, v. 65, p. 957–962,
 966 2018c.
- 967 FRANZO, G.; DELWART, E.; FUX, R.; HOUSE, B.; SU, S.; ZHOU, J.; SEGALÉS, J.
 968 Genotyping *Porcine Circovirus 3* (PCV-3) Nowadays: Does It Make Sense? **Viruses**,
 969 v. 12, p. 265, 2020.
- 970 FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Wild Boar: A Reservoir of Foodborne Zoonoses.
 971 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16(3), p. 153-165, 2019.
- 972 FUX, R.; SÖCKLER, C.; LINK, E.K.; RENKEN, C.; KREJCI, R.; SUTTER, G.;
 973 RITZMANN, M.; EDDICKS, M. Full genome characterization of *Porcine circovirus*
 974 *type 3* isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. **Virology**
 975 **Journal**, v. 15, p. 25, 2018.
- 976 GARCIA-MORANTE, B.; SEGALÉS, J.; FRAILE, L.; PÉREZ DE ROZAS, A.;
 977 MAITI, H.; COLL, T.; SIBILA, M. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-
 978 induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: A Comparative
 979 Review. **Journal of Comparative Pathology**, v.154, p. 125–134, 2016.
- 980 GARCIA-MORANTE, B.; SEGALÉS, J.; FRAILE, L.; LLARDÉN, G.; COLL, T.;
 981 SIBILA, M. Potential use of local and systemic humoral immune response parameters
 982 to forecast *Mycoplasma hyopneumoniae* associated lung lesions. **PLoS One**, v. 5;12(4),
 983 p. 1-14, 2017.
- 984 GALDEANO, J.V.B.; BARALDI, T.G.; FERRAZ, M.E.S.; ALMEIDA, H.M.S.;
 985 MECHELER-DREIBI, M.L.; COSTA, W.M.T.; MONTASSIER, H.J.; MATHIAS, L.
 986 A.; OLIVEIRA, L. G. Cross-sectional study of seropositivity, lung lesions and
 987 associated risk factors of the main pathogens of Porcine Respiratory Diseases Complex
 988 (PRDC) in Goiás, Brazil. **Porcine Health Management**, v. 5, n. 23, P.1-7, 2019.

- 990 GAVA, D.; ZANELLA, E. L.; MORES, N.; CIACCI-ZANELLA, J. R. Transmission of
991 *Porcine circovirus 2* (PCV-2) by semen and viral distribution in different piglet
992 tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 70-76, 2008.
- 993 GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.;
994 CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS J. A proposal on *Porcine*
995 *circovirus type 2* (PCV-2) genotype definition and their relation with postweaning
996 multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v.
997 128(1-2), p. 23-35, 2008.
- 998 GRAU-ROMA, L.; HJULSAGER, C.K.; SIBILA, M.; KRISTENSEN, C.S.; LÓPEZ-
999 SORIA S; ENØE, C.; CASAL, J.; BØTNER, A.; NOFRARIAS, M.; BILLE-HANSEN,
1000 V.; FRAILE, L.; BAEKBO, P.; SEGALÉS, J.; LARSEN, L.E. Infection, excretion and
1001 seroconversion dynamics of *Porcine circovirus type 2* (PCV-2) in pigs from post-
1002 weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and
1003 Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 30, n. 135(3-4), p. 272-82, 2009.
- 1004 GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P.; WHITTLES, P. Production of Enzootic
1005 Pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*. **Veterinary Record**, v. 77, n. 42, p. 1247-1257,
1006 1968.
- 1007 HA, Z.; XIE, C. Z.; LI, J. F.; WEN, S. B.; ZHANG, K. L.; NAN, F. L.; ZHANG, H.;
1008 GUO, Y. C.; WANG, W.; LU, H. J.; JIN, N. Y. Molecular detection and genomic
1009 characterization of *Porcine circovirus 3* in pigs from Northeast China. **BMC**
1010 **Veterinary Research**, v. 14(1), p.1-7, 2018.
- 1011
1012 HAYASHI, S.; OHSHIMA, Y.; FURUYA, Y.; NAGAO, A.; OROKU,
1013 K.; TSUTSUMI, N.; SASAKAWA, C.; SATO, T. First detection of *Porcine circovirus*
1014 *type 3* in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 26, p. 1-15, 2018.
- 1015 HAIJUN, J.; DAN, W.; JING, W.; SHANSHAN, Z.; RUIPING, S.; XINXIN, R.; JIJIG,
1016 T.; RONG, Q.; LEIHO, Z. L.I.; JUN, C.; YUXIN, G.; YANYANG, X.I.; HUIQI, S.; F
1017 ENG, Y.; LI, W.; JUE, L. Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome
1018 in Piglets by Infection with *Porcine Circovirus Type 3*. **Journal of Virology**, v. 93 (4),
1019 p. 9492 – 9507, 2019.
- 1020 HAN, H.Y.; ZHENG, H.H.; ZHAO, Y.; TIAN, R.B.; XU, P.L.; HOU, H.L.; CHEN,
1021 H.Y.; YANG, M.F. Development of a SYBR green I-based duplex real-time
1022 fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine epidemic
1023 diarrhea virus and *Porcine circovirus 3*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 44, p. 44-
1024 50, 2019.
- 1025 HADEN, C.; PAINTER, T.; FANGMAN, T.; HOLTKAMP, D. Assessing production
1026 parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma*
1027 *hyopneumoniae* in finishing pigs in a large production system. In: Proceedings of the
1028 AASV, 2012. **Anais...** Denver, Colorado, 2012. p.75-76.
- 1029 HANNAN, P.C.; BHOGAL, B.S.; FISH, J.P. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on
1030 experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate contain-
1031 ing mycoplasmas, bacteria and viruses. **Research in Veterinary Science**, v. 33, p. 76-
1032 88, 1982.

- 1033 HERDT, G.; MACIEL, A.E.; MARTINS, M; BENNEMANN, P. E. High prevalence of
1034 *Porcine circovirus 2*, *Parvovirus*, and pathogenic leptospire in mummified swine
1035 fetuses in Southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 4, p.1-6, 2019.
- 1036 HOLST, S.; YESKE, P.; PIETERS, M. Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae*
1037 from breed to wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure
1038 and medication. **Journal of Swine Health and Production**, v.23, n.6, p. 321-330,
1039 2015.
- 1040 HOLTkamp, D. J.; J. B.; KLIEBENSTEIN, E. J.; NEUMANN, J. J. ;ZIMMERMAN,
1041 H.F.; ROTTO, T. K. ;YODER, C. ;WANG, P. E.; ESKE, C. L.; MOWRER, C. A.
1042 Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome
1043 virus on United States pork producers. **Journal of Swine Health and Production**, v.
1044 21, p. 72–84, 2013.
- 1045 HOUGH, K.P.; ROGERS, A.M.; ZELIC, M.; PARIS, M.; HEILMAN, D.W.
1046 Transformed cell-specific induction of apoptosis by *Porcine circovirus type 1* viral
1047 protein 3. **Journal of General Virology**, v. 96 (2), p. 351-359, 2015.
- 1048 IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
1049 AGRICULTURAL. 2020. Suíno -Efetivo do rebanho 2019. Disponível em:
1050 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/> Acessado em: 18/05/2020.
- 1051 KLAUMANN, F.; CORREA-FIZ, F.; FRANZO, G.; SIBILA, M.; NÚÑEZ, J.I.,
1052 SEGALÉS, J. Current Knowledge on *Porcine circovirus 3* (PCV-3): A Novel Virus
1053 With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry. **Frontiers in Veterinary Science**,
1054 v. 5, p. 1-42, 2018.
- 1055 KLAUMANN, F.; CORREA-FIZ, F.; SIBILA, M.; NÚÑEZ, J.I.; SEGALÉS, J.
1056 Infection dynamics of *Porcine circovirus type 3* in longitudinally sampled pigs from
1057 four Spanish farms. **Veterinary Record**, v.18, p. 1-7, 2019a.
- 1058 KLAUMANN, F.; DIAS-ALVES, A.; CABEZÓN, O.; MENTABERRE, G.;
1059 CASTILLO-CONTRERAS, R.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; CASAS-DÍAZ, E.; SIBILA, M.;
1060 CORREA-FIZ, F.; SEGALÉS, J. *Porcine circovirus 3* is highly prevalent in serum and
1061 tissues and may persistently infect wild boar (*Sus scrofa scrofa*). **Transboundary and**
1062 **Emerging Diseases**, v. 66(1), p. 91–101, 2019b.
- 1063 KEDKOVID, R.; WOONWONG, Y.; ARUNORAT, J.; SIRISEREewan, C.;
1064 SANGPRATUM, N.; KESDANGSAKONWUT, S.; TUMMARUK, P.; TEANKUM,
1065 K.; ASSAVACHEEP, P.; JITTIMANEE, S.; THANAWONGNUWECH, R. Porcine
1066 circovirus type 3 (PCV-3) shedding in sow colostrum. **Veterinary Microbiology**, v.
1067 220, p. 12-17, 2018.
- 1068 KEULING, O.; SANGE, M.; ACEVEDO, P.; PODGORSKI, T.; SMITH, G.;
1069 SCANDURA, M.; APOLLONIO, M.; FERROGLIO, E.; VICENTE, J. Guidance on
1070 estimation of wild boar population abundance and density: Methods, challenges,
1071 possibilities. **EFSA Supporting Publications**, v. 15, p. 1–48, 2018.
- 1072 KICH, J.D.; KUCHIISHI, S.S.; MORES M.A.Z.; LARA, A.C. Agentes bacterianos de
1073 pneumonia associados à infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Acta Scientiae**
1074 **Veterinariae**, v. 38(Suppl 1), p. 17-27, 2010.

- 1075 KIM, J.; CHUNG, H.K.; JUNG, T. Postweaning multisystemic wasting syndrome of
1076 pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **Journal**
1077 **Veterinary Medicine and Science**, v. 64(1), p. 57–62, 2002.
- 1078 KIM, S.C.; NAZKI, S.; KWON, S.; JUHNG, J.H.; MUN, K.H.; JEON, D.Y.; JEONG,
1079 C.G.; KHATUN, A., KANG, S.J.; KIM, W.I. The prevalence and genetic characteristics
1080 of *Porcine circovirus type 2* and 3 in Korea. **BMC Veterinary Research**, v.14, p. 1-9,
1081 2018a.
- 1082 KIM, S.H.; PARK, J.Y.; JUNG, J.Y.; KIM, H.Y.; PARK, Y.R.; LEE, K.K.; LYOO,
1083 Y.S.; YEO, S.G.; PARK, C.K. Detection and genetic characterization of *Porcine*
1084 *circovirus 3* from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea. **Journal of**
1085 **Veterinary Science**, v. 19, p. 721–724. 2018b.
- 1086 KU, X.; CHEN, F.; LI, P.; WANG, Y.; YU, X.; FAN, S.; QIAN, P.; WU, M.; HE, Q.
1087 Identification and genetic characterization of *Porcine circovirus type 3* in
1088 China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64(3), p.703-708, 2017.
- 1089 KUKUSHKIN, S.; BABORENKO, E.; BAYBIKOV, T.; MIKHALISHIN, V.;
1090 DOMSKIY, I. Seroprevalence of antibodies to mainporcine infectious pathogens in
1091 wild boar in some regions of Russia. **Acta Silvatica et Lignaria Hungarica**, v. 5, p.
1092 147-152, 2009.
- 1093 KWON, T.; YOO, S.J.; PARK, C.K.; LYOO, Y.S. Prevalence of novel *Porcine*
1094 *circovirus 3* in Korean pig populations. **Veterinary Microbiology**, v. 207, p. 178–80,
1095 2017.
- 1096 LEME, R. A.; OLIVEIRA, T. E. S.; ALCÂNTARA, B. K.; SELWYN, A; HEADLEY,
1097 A. S.; ALFIERI, A. F.; YANG, M.; ALFIERI, A.A. Clinical Manifestations of
1098 *Senecavirus A* Infection in Neonatal Pigs, Brazil, 2015. **Emerging Infectious Diseases**,
1099 v. 22, n. 7, p. 1238-1241, 2016.
- 1100 LIU, S.; LI, W.; WANG, Y.; GU, C.; LIU, X.; CHARREYNE, C.; FAN, S.; HE,
1101 Q. Coinfection with *Haemophilus parasuis* serovar 4 increases the virulence of *Porcine*
1102 *circovirus type 2* in piglets. **Virology Journal**, v. 14, p. 1-9, 2017.
- 1103 MAES, D.; SIBILA, M.; KUHNERT, P.; SEGALES, J.; HAESEBROUCK, F.;
1104 PIETERS, M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge
1105 gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p.
1106 110-124, 2017.
- 1107 MARÉ, C. J.; SWITZER, W. P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae* a causative
1108 agent of virus pig pneumonia. **Veterinary Medicine**, v. 60, p. 841-846, 1965.
- 1109 MAROIS, C.; TOCQUEVILLE, V.; LE POTIER, M.; HARS, J.; KOBISCH, M.
1110 Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in French wild boars. In: Internacional Pig
1111 Veterinary Society, 19th, 2006. **Anais...** Copenhagen, Denmark, 2006, p.213.
- 1112 MENG, X.J. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. **Transboundary and**
1113 **Emerging Diseases**, v. 59, p. 85–102, 2012.

- 1114 MENG, X.J. Circoviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6º ed.
1115 Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2013, p. 1034-1065.
- 1116 MICHIELS, A.; VRANCKX, K.; PIEPERS, S.; SACRISTÁN, R.D.P.; ARSENAKIS,
1117 I.; BOYEN, F.; HAESBROUCK, F.; MAES, D. Impact of diversity of *Mycoplasma*
1118 *hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. **Veterinary Research**, v. 48,
1119 p. 1-14, 2017.
- 1120 MIRANDA, L. L. de; LUI, J. F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das
1121 regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 38, no. 11, p.
1122 1289–1295, 2003.
- 1123 MORÉS, M.A.Z.; OLIVEIRA FILHO, J.X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C.S.;
1124 BARCELLOS, D.E.S.N.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. Aspectos patológicos e
1125 microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa**
1126 **Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 725-733, 2015.
- 1127 MOURA-BRITTO, M. de; PATROCÍNIO, D. N. M. A fauna de espécies exóticas no
1128 Paraná: contexto nacional e situação atual. In: CAMPOS, J. B.; MÜLLER, M. de G. P.
1129 T. C. R. C.(eds.). UNIDADES DE CONSERVAÇÃO Ações para valorização da
1130 biodiversidade. Curitiba, PR: Secretaria de Estado de Meio Ambiente, 2006. p. 53–94.
- 1131 POSSATTI, F.; HEADLEY, S.A.; LEME, R.A.; DALL AGNOL, A.M.; ZOTTI, E.; DE
1132 OLIVEIRA, T.E.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. et al. Viruses associated with
1133 congenital tremor and high lethality in piglets. **Transboundary and Emerging**
1134 **Diseases**, 65(2):p. 331-337, 2018.
- 1135 OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Informações sobre focos de doenças.
1136 2020. Disponível em:
1137 <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI>.
1138 Acessado em: 12 Dez 2020.
- 1139 OPRIESSNIG, T.; MENG, X.; HALBUR, P. G. *Porcine circovirus type 2*– associated
1140 disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis,
1141 diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostical**
1142 **Investigation**, v.19, p. 591 - 615, 2007.
- 1143 OUYANG, T.; ZHANG, X.; LIU, X.; REN, L. Co-Infection of Swine with *Porcine*
1144 *Circovirus Type 2* and Other Swine Viruses. **Viruses**, v. 11(2), p. 1-14, 2019.
- 1145 OTAKE, S.; DEE, S.; CORZO, C.; OLIVEIRA, S.; DEEN, J. Long-distance airborne
1146 transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine
1147 population infected with multiple viral variants. **Veterinary Microbiology**, v.145,
1148 p.198-208, 2010.
- 1149 PAARLBERG, P. L. Updated estimated economic welfare impacts of porcine epidemic
1150 diarrhea virus (PEDV). **Research in Agricultural and Applied Economics**. Purdue
1151 University, Department of Agricultural Economics, Working Papers, p. 1-38.
1152 Disponível em: <https://ageconsearch.umn.edu/record/174517> Acessado em: 29/06/2020.
- 1153 PALLARES, F. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S. D.; VILLAR, D.;
1154 JANKE, B. H.; HOFFMAN, L. J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US

- 1155 field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of**
1156 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14 (6), p. 515-519, 2020.
- 1157 PALINSKI, R.; PIÑEYRO, P.; SHANG, P.; YUAN, F.; GUO, R.; FANG, Y.; BYERS,
1158 E.; HAUSE, B. A. Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses
1159 Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive
1160 Failure. **Journal of Virology**, v. 91, p. 1-42, 2017.
- 1161 PANTOJA, L.G.; PETTIT, K.; DOS SANTOS, L.F.; TUBBS, R.; PIETERS, M.
1162 *Mycoplasma hyopneumoniae* genetic variability within a swine operation. **Journal of**
1163 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, p.175-179, 2016.
- 1164 PARK, C.; JEONG, J.; KANG, I.; CHOI, K.; PARK, S.J.; CHAE, C. Increased fucosyl
1165 glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella*
1166 *multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. **Veterinary**
1167 **Research**, v.12, p. 1-6, 2016.
- 1168 PHAN, T.G.; GIANNITTI, F.; ROSSOW, S.; MARTHALER, D.; KNUTSON, T.P.; LI,
1169 L.; DENG, X.; RESENDE, T.; VANNUCCI, F.; DELWART, E. Detection of a novel
1170 circovirus PCV-3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Virology**
1171 **Journal**, v. 13, p.1-8, 2016.
- 1172 PEDROSA, F.; SALERNO, R.; PADILHA, F.V.B. Current distribution of invasive
1173 feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. **Natureza &**
1174 **Conservação**, v. I3, p.84-87, 2015.
- 1175 PETERSEN, A.C.; ONEAL, D.C.; SEIBEL, J.R.; POEL, K., DAUM; C.L.,
1176 DJORDJEVIC, S.P.; MINION, F.C. Cross reactivity among the swine mycoplasmas as
1177 identified by protein microarray. **Veterinary Microbiology**, v. 192, p. 204-212, 2016.
- 1178 PIETERS, M.; PIJOAN, C.; FANO, E.; DEE, S. An assessment of the duration of
1179 *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population in pigs.
1180 **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 261-266, 2009.
- 1181 PIETERS, M. G.; MAES, D. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. **Diseases of Swine**.
1182 11^o ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2019. p. 863–883.
- 1183 PIETERS, M.; SIBILA, M. When is the best time to vaccinate piglets against
1184 *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Record**, v. 181, n. 1, p. 16–17, 2017.
- 1185 PRINZ, C.; STILLFRIED, M.; NEUBERT, L.K; DENNER, J. Detection of PCV-3 in
1186 German wild boars. **Virology Journal**, v.16, p. 1-7, 2019.
- 1187 RECH, R. R.; GAVA, D.; SILVA, M. C.; FERNANDES, L. T.; HAACH, V.; CIACCI-
1188 ZANELLA, J. R.; SCHAEFER, R. Porcine respiratory disease complex after the
1189 introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 65, p-
1190 1-7, 2018.
- 1191 RISCO, D.; SERRANO, E.; FERNÁNDEZ-LLARIO, P.; CUESTA, J.M.;
1192 GONÇALVES, P.; GARCIA-JIMÉNEZ, W.L.; MARTINEZ, R.; CERRATO, R.;
1193 VELARDE, R.; GÓMEZ, L.; SEGALÉS, J.; MENDONZA, J.H de. Severity of bovine

- 1194 tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. **PLoS**
1195 **One**, v. 9, p. 1-10, 2014.
- 1196 RODRIGUES, I.L.F.; CRUZ, A.C.M.; SOUZA, A.E.; KNACKFUSS, F.B.; COSTA,
1197 C.H.C.; SILVEIRA, R.L.; CASTRO, T.X. Retrospective study of porcine circovirus 3
1198 (PCV-3) in swine tissue from Brazil (1967-2018). **Brazilian Journal of Microbiology**,
1199 v. 51(3), p. 1391-1397, 2020.
- 1200 ROGERS, A.J.; HUANG, Y.W.; HEFFRON, C.L.; OPRIESSNIG, T.; PATTERSON,
1201 A.R.; MENG, X.J. Prevalence of the novel torque teno sus virus species k2b from pigs
1202 in the united states and lack of association with post-weaning multisystemic wasting
1203 syndrome or mulberry heart disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64,
1204 p.1877–1883, 2017.
- 1205 ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.;
1206 BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family circoviridae:
1207 establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of**
1208 **Virology**, v. 162, p.1447–63, 2017.
- 1209 SAEKHOW, P.; KISHIZUKA, S., SANO, N., MITSUI, H., AKASAKI, H.,
1210 MAWATARI, T., & IKEDA, H. Coincidental detection of genomes of porcine
1211 parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. **The Journal of**
1212 **Veterinary Medical Science**, v. 77(12), p. 1581–1586, 2016.
- 1213 SAPORITI, V.; CRUZ, T.F.; CORREA-FIZ, F.; NÚÑEZ, J.I.; SIBILA, M.; SEGALÉS,
1214 J. Similar frequency of Porcine circovirus 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs
1215 affected by digestive or respiratory disorders and age-matched clinically healthy pigs.
1216 **Transboundary and Emerging Diseases**, v.67(1), p. 199-205, 2020.
- 1217 SAPORITI, V.; VALLS, L.; MALDONADO, J.; PEREZ, M.; CORREA-FIZ, F.;
1218 SEGALÉS, J.; SIBILA, M. Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and
1219 Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases. **Viruses**, v.13(2), p. 264,
1220 2021.
- 1221
1222 SARAIVA, G.L.; VIDIGAL, P.M.P.; ASSAO, V.S.; FAJARDO, M.L.M.; LORETO,
1223 A.N.S.; FIETTO, J.L.R.; BRESSAN, G.C.; LOBATO, Z.I.P.; ALMEIDA,
1224 M.R.; SILVA-JÚNIOR, A. Retrospective Detection and Genetic Characterization
1225 of *Porcine circovirus 3* (PCV-3) Strains Identified between 2006 and 2007 in Brazil.
1226 **Viruses**, v. 11(3), p. 1-11, 2019.
- 1227 SALVADOR, C.; FERNANDEZ, F. Using the Eurasian wild boar phenotype as a basis
1228 to document a new process of invasion by *Sus scrofa* L. in a Neotropical biodiversity
1229 hotspot **Wildlife Biology in Practice**, v. 10(3), p. 22-19, 2014.
- 1230 SARLI, G.; MORANDI, F.; PANARESE, S.; BACCI, B.; FERRARA, D.; BIANCO,
1231 C.; FUSARO, L.; BACCI, M. L.; GALEATI, G.; DOTTORI, M.; BONILAURI, P.;
1232 LELLI, D.; LEOTTI, G.; VILA, T.; JOISEL, F.; ALLAN, G.; BENAZZI, C.;
1233 OSTANELLO, F. Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts
1234 inseminated with PCV2b spiked semen. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 54, p.1-9 ,
1235 2012.
- 1236 SCHWEER, W.P.; SCHWARTZ, K.; BURROUGH, E.R.; YOON, K.J.; SPARKS, J.C.;
1237 GABLER, N.K. The effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and

- 1238 porcine epidemic diarrhea virus challenge on growing pigs I: Growth performance and
1239 digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 94(2), p. 514-22, 2016.
- 1240 SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal**
1241 **Health Research Reviews**, v. 6, p. 119–142, 2005.
- 1242 SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK,
1243 H.; LARSEN, L.E.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.;
1244 MASKERTZ, A.; FREDHOLN, M.; FOSSUM, S.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-
1245 ZURWIEDEN, M.; BEATTIE, D.; ARMSTRONG, B.; GRASSLAND, B.; BAEKBO,
1246 P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary**
1247 **Record**, v.162, p. 867–868, 2008.
- 1248 SEGALÉS, J. *Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infections: Clinical signs, pathology*
1249 *and laboratory diagnosis*. **Virus Research**, v. 164(1-2), p. 10-19, 2012.
- 1250 SEVERO, D. R. T.; WERLANG, R. A.; MORI, A. P.; BALDI, K. R. A.; MENDES, R.
1251 E.; SURIAN, S. R. S.; COLDEBELLA, A.; KRAMER, B.; TREVISOL, I. M.;
1252 GOMES, T. M. A.; SILVA, V. S. Health profile of free-range wild boar (*Sus scrofa*)
1253 subpopulations hunted in Santa Catarina State, Brazil. **Transboundary and Emerging**
1254 **Diseases**, v. 00, p.1-13, 2020.
- 1255 SEWARD, N.W.; VERCAUTEREN, K.C.; WITMER, W.G.; ENGEMAN, R.M. Feral
1256 swine impacts on agricultural and the environment. **Sheep & Goat Research Journal**,
1257 v. 19, p. 24-40, 2004.
- 1258 SIBILA, M.; MENTABERRE, G.; BOADELLA, M.; HUERTA, E.; CASAS-DÍAZ, E.;
1259 VICENTE, J.; GORTÁZAR, C.; MARCO, I.; LAVÍN, S.; SEGALÉS, J. Serological,
1260 pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae*
1261 infection in the wild boar. **Veterinary Microbiology**, v.144, p. 214–218, 2010.
- 1262 SILVA, G.S.; YESKE, P.; MORRISON, R.B.; LINHARES, D.C.L. Benefit-cost
1263 analysis to estimate the payback time and the economic value of two *Mycoplasma*
1264 *hyopneumoniae* elimination methods in breeding herds. **Preventive Veterinary**
1265 **Medicine**, v.168, p. 95-102, 2019.
- 1266 SIQUEIRA, F. M.; THOMPSON, C.E.; VIRGINIO, V.G.; GONCHOROSKI, T.;
1267 REOLON, L.A.; ALMEIDA, L.; FONSÊCA, M.M. SOUZA, R.; PROSDOCIMI, F.;
1268 SCHRANK, I.S.; FERREIRA, H.; VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. New insights on
1269 the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome
1270 analysis. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2013.
- 1271 SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. Monitoramentos clínicos. In:
1272 SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. **Doenças dos Suínos**. 2º ed. Goiânia:
1273 Cãnone editorial, 2012. p. 889–892.
- 1274 SPONHEIM A, ALVAREZ J, FANO E, SCHMALING E, DEE S, HANSON D,
1275 WETZELL T, PIETERS M. Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep
1276 tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and
1277 naturally infected pigs early and late after infection. **Veterinary Microbiology**, v. 19, p.
1278 1-29, 2020.

- 1279 STADEJEK, T.; WOŹNIAK, A.; MIŁEK, D.; BIERNACKA, K. First detection of
1280 *Porcine circovirus type 3* on commercial pig farms in Poland. **Transboundary and**
1281 **Emerging Diseases**, v. 64, p. 1350– 1353, 2017.
- 1282 ŠTUKELJ, M.; TOPLAK, I.; VENGUŠT, G. Prevalence of antibodies against selected
1283 pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. **Slovenian Veterinary Research**, v.
1284 51, p. 21–28, 2014.
- 1285 SUKMAK, M.; THANANTONG, N.; POOLPERM, P., BOONSOONGNERN,
1286 A.; RATANAVANICHROJN, N.; JIRAWATTANAPONG, P.; WOONWONG,
1287 Y.; SODA, N.; KAMINSONSAKUL, T.; PHUTTAPATIMOK S.; WAJJWALKU, W.
1288 The retrospective identification and molecular epidemiology of *Porcine circovirus type*
1289 *3* (PCV-3) in swine in Thailand from 2006 to 2017. **Transboundary and Emerging**
1290 **Diseases**, v. 66, p. 611–616, 2019.
- 1291 SUN, J.; WEI, L.; LU, Z.; MI, S.; BAO, F.; GUO, H.; TU, C.; ZHU, Y.; GONG, W.
1292 Retrospective study of *Porcine circovirus 3* infection in China. **Transboundary and**
1293 **Emerging Diseases**, v. 65(3), p. 607-613, 2018.
- 1294 TAKEUTI, K.L.; WATANABE, T.T.N.; DE CASTRO, L.A.; DRIEMEIER, D.;
1295 BARCELLOS, D.E.S.N. Caracterização histopatológica e imuno-histoquímica da
1296 pneumonia causada pela co-infecção por *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma*
1297 *hyopneumoniae* em suínos. **Acta Scientiae Veterinae**, v. 41,p. 11-17, 2013.
- 1298 TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and
1299 picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralblatt für**
1300 **Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 226(2), p. 153–167, 1974.
- 1301 TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M., GRIE; W. Studies on
1302 epidemiology and pathogenicity of *Porcine circovirus*. **Archives of Virology**, v. 91, p.
1303 271–276, 1986.
- 1304 TOCHETTO, C.; LIMA, D.A.; VARELA, A.P.M.; LOIKO, M.R.; PAIM, W.P.;
1305 SCHEFFER, C.M.; HERPICH, J.I.; CERVA, C.; SCHMITD, C.; CIBULSKI, S.P.;
1306 SANTOS, A.C.; MAYER, F.Q.; ROEHE, P. M. Full-Genome Sequence of *Porcine*
1307 *Circovirus type 3* recovered from serum of sows with stillbirths in
1308 Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p.5–9, 2018.
- 1309 YAZAWA, S.; OKADA, M.; ONO, M.; FUJII, S.; OKUDA, Y.; SHIBATA, I.; KIDA,
1310 H. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus
1311 (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology** v. 98,
1312 p.221–228, 2004.
1313
- 1314 YE, X.; BERG, M.; FOSSUM, C.; WALLGREN, P.; BLOMSTRÖM, A.L. Detection
1315 and genetic characterization of *Porcine circovirus 3* from pigs in Sweden. **Virus Genes**,
1316 v. 54, p. 466–469, 2018.
- 1317 WANG, W.; SUN, W.; CAO, L.; ZHENG, M.; ZHU, Y.; LI, W.; LIU, C.; ZHUANG,
1318 X.; XING, J.; LU, H.; LUO, T.; JIN, N. An epidemiological investigation of *Porcine*
1319 *circovirus 3* infection in cattle in Shandong province, China. **BMC Veterinary**
1320 **Research**, v. 15 (60), p.1-8, 2019.

- 1321 WEISBROTH, S. H.; KOHN, D. F. Bacterial, Mycoplasmal, and Mycotic Infections.
1322 In: SUCKOW, M. A.; HANKENSON, F.C.; WILSON, R.P.; FOLEY, P. L. **The**
1323 **Laboratory Rat**. 3^o ed. Elsevier, 2020, p. 451-539.
- 1324 WILSON, S.; VAN BRUSSEL, L.; SAUNDERS, G.; RUNNELS, P.; TAYLOR, L.;
1325 FREDRICKSON, D.; SALT, J. Vaccination of piglets up to 1 week of age with a
1326 single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine induces protective immunity within 2
1327 weeks against virulent challenge in the presence of maternally derived antibodies.
1328 **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p. 720–724, 2020.
- 1329 WILLIAMSON, S.; WILSON, L.; COLLINS, R.; FLOYD, T. GRIERSONS,
1330 DASTJERDI A. Multisystemic inflammation in piglets in a herd with congenital tremor
1331 and concurrent deformities. In: European Symposium of Porcine Health Management,
1332 11th, 2019. **Anais...** Utrecht, The Netherlands 2019. p. 1.
- 1333 VENGUST, G.; VALENCAK, Z.; BIDOVEC, A. A Serological Survey of Selected
1334 Pathogens in Wild Boar in Slovenia. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53(1), p. 24-
1335 7, 2006.
- 1336 ZHAI, S.L.; ZHOU, X.; ZHANG, H.; HAUSE, B.M.; LIN, T.; LIU, R.; CHEN, Q.L;
1337 WEI, W.K.; LV, D.H.; WEN, X.H. Comparative epidemiology of *Porcine circovirus*
1338 *type 3* in pigs with different clinical presentations. **Virology Journal**, v. 14, p. 1-6,
1339 2017.
- 1340 ZHANG HH, HU WQ, LI JY, LIU TN, ZHOU JY, OPRIESSNIG T, XIAO CT. Novel
1341 circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan
1342 province, China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67(3), p.1057-1061,
1343 2020.
- 1344 ZHENG, S.; WU, X.; ZHANG, L.; XIN, C.; LIU, Y.; SHI J.; PENG, Z.; XU, S.; FU,
1345 F.; YU, J.; SUN, W.; XU, S.; LI, J.; WANG, J. The occurrence of *Porcine circovirus 3*
1346 without clinical infection signs in Shandong Province. **Transboundary and Emerging**
1347 **Diseases**, v. 64(5), p. 1337-1341, 2017.
- 1348 ZHENG, S.; SHI, J.; WU, X.; PENG, Z.; XIN, C.; ZHANG, L.; LIU, Y.; GAO, M.;
1349 XU, S.; HAN, H.; YU, J.; SUN, W.; CONG, X.; LI, J.; WANG, J. Presence of *Torque*
1350 *teno sus virus 1* and 2 in *Porcine circovirus 3*-positive pigs. **Transboundary and**
1351 **Emerging Diseases**, v. 65(2), p. 327-330, 2018.
- 1352 ZOU, Y.; ZHANG, N.; ZHANG, J.; ZHANG, S.; JIANG, Y.; WANG, D.; TAN, Q.;
1353 YANG, Y.; WANG, N. Molecular detection and sequence analysis of *Porcine*
1354 *circovirus type 3* in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive
1355 problems in Hunan, China. **Archives of Virology**, v.163(10), p. 2841-2847, 2018.

1356 **4 HIPÓTESE**

1357

1358 Infeções ocasionadas por circovírus suíno 3 e por *Mycoplasma*

1359 *hyopneumoniae* são endêmicas em suínos asselvajados de vida livre presentes na região

1360 dos Campos Gerais, PR.

1361 **5 OBJETIVOS**

1362 5.1 OBJETIVO GERAL

1363 DESCREVER A OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 E
1364 POR *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* EM REBANHOS DE SUÍNOS ASSELVAJADOS DE VIDA
1365 LIVRE NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PR.

1366

1367 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1368

1369 IDENTIFICAR E CARACTERIZAR POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES O
1370 CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS,
1371 PARANÁ;

1372 SEQUENCIAR O GENOMA COMPLETO E DETERMINAR A FILOGENIA DE
1373 CEPAS DE CIRCOVÍRUS SUÍNO 3 PROVENIENTES DE SUÍNOS ASSELVAJADOS. REALIZAR
1374 ANÁLISES FILOGENÉTICAS COMPARATIVAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE CEPAS DE PCV-3
1375 IDENTIFICADAS NESTE ESTUDO E OUTRAS CEPAS IDENTIFICADAS NO BRASIL E EM OUTROS
1376 PAÍSES PROVENIENTES DE SUÍNOS DOMÉSTICOS E ASSELVAJADOS;

1377 INVESTIGAR POR MEIO DOS TESTES ELISA INDIRETO E IMUNO-
1378 HISTOQUÍMICA A PREVALÊNCIA, POR SEXO E FAIXA ETÁRIA, DE *MYCOPLASMA*
1379 *HYOPNEUMONIAE* EM SUÍNOS ASSELVAJADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERIAS, PARANÁ.

1380 **6 ARTIGO A – PORCINE CIRCOVIRUS 3a FIELD STRAINS IN FREE-**
1381 **LIVING WILD BOARS IN PARANÁ STATE, BRAZIL (DOI**
1382 **10.3390/ANI11061634)**

Communication

Porcine Circovirus 3a Field Strains in Free-Living Wild Boars in Paraná State, Brazil

Tatiana Carolina Gomes Dutra de Souza ^{1†}, Danielle Gava ^{2†}, Rejane Schaefer ², Raquel Arruda Leme ¹, Gisele da Silva Porto ¹ and Amauri Alcindo Alfieri ^{1,*}

¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Campos Universitário, Londrina 86057-970, PR, Brazil; tatianacdutra@hotmail.com (T.C.G.D.d.S.); raquelarrudaleme@gmail.com (R.A.L.); giselesilvaporto@gmail.com (G.d.S.P.)

² Embrapa Suínos e Aves, Concórdia 89715-899, SC, Brazil; danielle.gava@embrapa.br (D.G.); rejane.schaefer@embrapa.br (R.S.)

* Correspondence: alfieri@uel.br

† These authors contributed equally to this study.

Simple Summary: Porcine circovirus 3 (PCV-3) was first identified in pigs in the USA and was subsequently detected in several other countries, including Brazil. PCV-3 can be associated with diseases in pigs. To date, there are only a few reports of PCV-3 in wild boars worldwide. This study aimed to investigate the presence of PCV-3 in wild boars in Paraná state, Brazil. The results revealed that PCV-3 was present in the serum and lungs of the sampled boars. The complete genome of the PCV-3a strain was determined and compared with other PCV-3 strains around the world. Phylogenetic analysis has shown a close relationship to the strains already described in domestic and wild pigs. At this moment, there is no evidence that PCV-3 causes disease in wild boars. However, the monitoring of circulation of PCV-3 in wild boars is important for pig industry biosecurity because these animals share pathogens with domestic pigs.

Abstract: Porcine circovirus 3 (PCV-3) was identified in domestic pigs worldwide. Although PCV-3 has also been detected in wild boars, information regarding its circulation in this free-living animal species is scarce. To investigate PCV-3 occurrence in free-living wild boars in Brazil, 70 serum samples collected between January 2017 and June 2019 in Paraná state, Brazil were analyzed by PCR assay. Amplicons measuring 330 bp in length were amplified in seven (10.0%) of the serum samples and confirmed to be PCV3-specific by nucleotide (nt) sequencing. As the amplified products from the serum samples yielded only intermediate levels of viral DNA, lung samples from the seven PCR-positive wild boars were also evaluated by PCR. Of these samples, five lung samples were positive and provided high levels of viral DNA. The three lung samples that presented the highest levels of viral DNA were selected for amplification and sequencing of the whole PCV-3 genome. The three full-length sequences obtained were grouped in PCV-3 clade “a”, and the sequences exhibited 100% nucleotide similarity among them. The PCV-3 field strains of this study showed nucleotide and amino acid similarities of 98.5–99.8% and 98.8–100%, respectively, with whole-genome PCV-3 sequences from around the world.

Keywords: *Sus scrofa*; feral pig; circoviruses

Citation: de Souza, T.C.G.D.; Gava, D.; Schaefer, R.; Leme, R.A.; da Silva Porto, G.; Alfieri, A.A. Porcine Circovirus 3a Field Strains in Free-Living Wild Boars in Paraná State, Brazil. *Animals* **2021**, *11*, 1634. <https://doi.org/10.3390/ani11061634>

Academic Editor: Fabio Ostanello

Received: 23 April 2021

Accepted: 24 May 2021

Published: 31 May 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Porcine circovirus 3 (PCV-3) belongs to the genus *Circovirus* and was recently identified in the USA through metagenomic analysis [1,2]. Subsequently, PCV-3 has been reported in several countries of South America, Europe, and Asia [3–10]. Retrospective

studies revealed PCV-3 circulation since 1993 in Sweden [11], 1996 in China [12] and Spain [5], and 2006 in Brazil [13].

The PCV-3 genome consists of 1999–2001 nucleotides (nt) of circular, single-stranded DNA featuring two major open reading frames (ORFs). ORF1 encodes the replicase protein (Rep), which is composed of 296–297 amino acids (aa); this ORF is the most conserved region of the genome and shares 55% aa identity with the Rep of porcine circovirus 2 (PCV-2) [1]. ORF2 is located on the negative strand and encodes the capsid protein (Cap), the only constituent of the viral capsid; it is composed of 214 aa, sharing approximately 26–37% identity with the PCV-2 Cap protein [1,2]. ORF3 encodes a putative 231-aa protein, and its function has not been elucidated [1].

The PCV-3 sequences available in GenBank have high nucleotide identity between strains [14]. The evolutionary analysis in phylogenetic studies indicate the presence of a common ancestor dated approximately 1967 [15]. Considering a maximum genetic distance of 3% within the complete genome and a bootstrap support higher than 90%, Franzo and colleagues [16] suggest only two clades that can be defined as genotypes. Specifically, PCV-3a forms clade 1, while PCV-3b form clade 2. To date, only two strains are included in clade 2 (GenBank access numbers MG372488 and MG372490).

PCV-3 has been detected in symptomatic [1,2] and asymptomatic pigs [14] and in other animal species, including dogs [17], cattle [18] and wild hosts [19]. The PCV-3 prevalence in domestic pigs varies from 6.5 to 68.6% [4–6,10,12,14], while in wild boars, it varies from 9.1 to 57.1% and which, due to their habits, may contribute to the spread of the virus [13,20–22]. PCV-3 infection in wild boars has been reported in Germany [20], Italy [21], Spain [22], and recently, in Brazil [13].

Brazil is the fourth-largest pork producer and exporter worldwide, and the state of Paraná is the second-largest pork producer in Brazil, accounting for 19.8% of total pork meat production in 2019 [23]. The total population of free-living wild boars in Brazil is unknown, but sightings are common in crop fields and near livestock farms in various Brazilian regions, including Campos Gerais, Paraná state [24]. This study attempted to investigate PCV-3 occurrence in free-living wild boars in Campos Gerais, Paraná state, and to genetically characterize the PCV-3 strains detected in this animal species.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and was approved under identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

2.2. Sample Collection

From January 2017 to January 2019, 70 free-living wild boars were harvested in the Campos Gerais region of the state of Paraná; specifically, 14 juvenile females, 14 juvenile males, 31 adult females, and 11 adult males were obtained. The classification of the animals into juvenile and adult animals was performed according to Hebeisen et al. (2008) [25].

Hunting was performed by exotic wildlife controller agents who were authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) according to IN 03/2013 [26], registered in the Federal Technical Register of Potentially Pollutive Activity (CTF/APP), and closely monitored by the Brazilian Army. Paired serum and lung samples were collected from all 70 free-living wild boars and stored at -80°C . Sera were used to assess the frequency of PCV-3 infection in the studied population, as is commonly carried out in pioneering studies in wild boars [21,22].

After screening of serum samples, the lungs of the animals that had positive serum samples were evaluated for the presence of PCV-3 following the same methodology. This

tissue was selected because it is a replication site of the virus and a high viral load can be found [22].

2.3. DNA Extraction and PCR

Viral DNA was extracted from serum samples using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR assays for PCV-3 diagnosis were performed using a pair of primers (5'-CCA CAG AAG GCG CTA TGT C-3' and 5'-CCG CAT AAG GGT CGT CTT G-3') that amplify a 330-bp fragment of the capsid gene [1] in 25- μ L final reaction volume. The amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose-TBE gel and stained with ethidium bromide.

2.4. Genome Sequencing

Complete genome sequencing of three PCV-3 PCR-positive lung samples was performed using primers 5'-CAC CGT GTG AGT GGA TAT AC C-3', 5'-GTC GTC TTG GAG CCA AGT G-3', 5'-TGT TGT ACC GGA GGA GTG-3', and 5'-GAA GTT GCG GAG AAG ATG-3', described by Palinski et al. (2017) [1] and a primer with degenerate 3' end GCCGAC-TAATGCGTAGTCNNNNNNNNN described by Franzo et al. (2018) [6]. The selection of the three PCV-3 samples for sequencing was based on viral load and on wild boar geographic location.

The amplicons were purified using the PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), quantified with a Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA), and analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. The ABI3500 Genetic Analyzer and BigDye™ Terminator v3.1 A Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for sequencing, which was performed in both directions with the forward and reverse primers employed in the PCR assay. Quality assessment and sequence analyses were determined by Phred [27] and Lucy [28] software. The sequences were assembled using Cap3 [27] to generate consensus sequences.

2.5. Genome Analyses

Complete PCV-3 genome sequences were accessed on GenBank. The misaligned strings were excluded from the alignment. Therefore, only one sequence was selected as representative of all identical sequences. The construction of the tree comprised complete PCV-3 sequences from wild boars and domestic pigs from different continents and recent and contemporary strains. As reported by Franzo and colleagues [16], two representative sequences of the PCV-3b clade were also included.

Phylogenetic analysis of the complete genome sequences of PCV-3 was performed using the neighbor-joining (NJ) method in MEGA 6.0 software [29]. Bootstrap values were determined with 1000 replicates, and the evolutionary distances were computed using the Tamura 3 parameter model [29]. The genome sequences were compared with other PCV-3 sequences that are available in GenBank.

The complete PCV-3 sequences of this study and PCV-3 sequences from wild boars and domestic pigs from different continents and recent and contemporary strains were analyzed using BioEdit version 7.2.6.1 [30].

3. Results

PCV-3 was detected in 7 (10%) out of the 70 serum samples. PCV-3-positive samples were obtained from adult female boars from Castro and Ponta Grossa Counties. Additionally, five (71%) of the seven lung samples from wild boars with PCV-3-positive serum samples were positive. The complete genomes of the three sequenced PCV-3 Brazilian strains were deposited in GenBank (accession numbers: MT075517, MT075518, and MT075519). The sequences presented 100% nt similarity among themselves and were classified as PCV-3a (Figure 1).

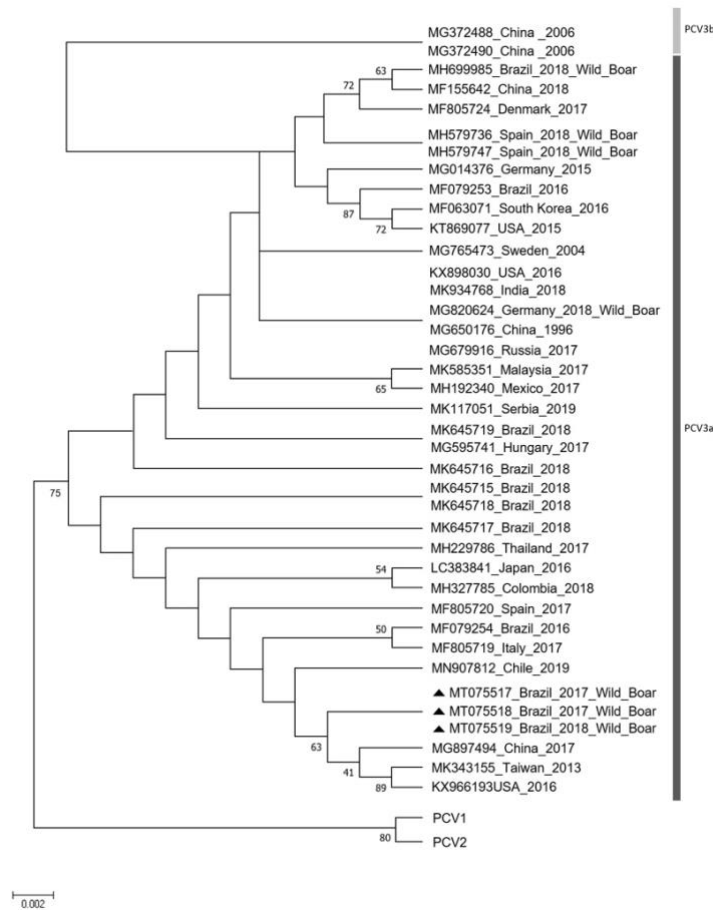


Figure 1. Phylogenetic tree of the full-length PCV-3 genome using the neighbor-joining method. Bootstrap values were determined with 1000 replicates, and the evolutionary distances were computed using the Tamura 3 parameter model. Evolutionary analyses were conducted with MEGA 6.0 software [29]. The three Brazilian PCV-3 field strains from free-living wild boars are labeled with a solid black triangle. The sequences of PCV-1 and PCV-2 were used as outgroups.

The Brazilian PCV-3 wild boar strains showed 99.6% nt similarity with Chilean (MN907812) and Chinese strains (MG897494) and 99.5% similarity with American (KX966193) and Taiwanese strains (MK343155) identified from domestic pigs.

The PCV-3 sequences described in this study (MT075517, MT075518, and MT075519) revealed 98.7–99.8% nt and 99.0–100% aa similarity with the Brazilian strains from domestic pigs (MF079254, MF079253, MK645715, MK645718, MK645719, MK645716, and MK645717) (Table 1), 98.5–99.8% nt and 98.8–100% amino acid (aa) sequence similarity with PCV-3 sequences from domestic pigs worldwide, and 98.6–99.2% nt and 98.9–99.5% aa sequence similarity with PCV-3 sequences from free-living wild boars (MH579736; MH579747; MG820624; MH699985).

Table 1. Similarities of nucleotides (nt) and amino acids (aa) of the complete genome of porcine circovirus 3 (PCV-3) sequences reported in this study and representative strains from other countries. The complete PCV-3 sequences were analyzed using BioEdit version 7.2.6.1 [30].

| Species | Representative PCV-3 Strains | | | | Representative Strains in This Study | | | | | | |
|---------------|------------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------------|------|----------|------|----------|------|------|
| | Continent | Country | Strain | Year | MT075517 | | MT075518 | | MT075519 | | |
| | | | | | nt | aa | nt | aa | nt | aa | |
| Swine | Asia | China | MG650176 | 1996 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | |
| | | China | MG372488 | 2006 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | |
| | | China | MG372490 | 2006 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | |
| | | China | MG897494 | 2017 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | |
| | | China | MF155642 | 2018 | 98.9 | 99.1 | 98.9 | 99.1 | 98.9 | 99.1 | |
| | | Taiwan | MK343155 | 2013 | 99.5 | 99.6 | 99.5 | 99.6 | 99.5 | 99.6 | |
| | | Korea | MF063071 | 2016 | 98.7 | 99.0 | 98.7 | 99.0 | 98.7 | 99.0 | |
| | | Japan | LC383841 | 2016 | 99.3 | 99.6 | 99.3 | 99.6 | 99.3 | 99.6 | |
| | | Thailand | MH229786 | 2017 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | |
| | | Malaysia | MK585351 | 2017 | 99.5 | 99.8 | 99.5 | 99.8 | 99.5 | 99.8 | |
| | | Russia | MG679916 | 2017 | 99.7 | 99.8 | 99.7 | 99.8 | 99.7 | 99.8 | |
| | | India | MK934768 | 2018 | 98.6 | 98.8 | 98.6 | 98.8 | 98.6 | 98.8 | |
| | Europe | Denmark | MF805724 | 2017 | 98.9 | 99.1 | 98.9 | 99.1 | 98.9 | 99.1 | |
| | | Germany | MG014376 | 2015 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | |
| | | Sweden | MG765473 | 2004 | 98.6 | 98.8 | 98.6 | 98.8 | 98.6 | 98.8 | |
| | | Spain | MF805720 | 2017 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | |
| | | Hungary | MG597441 | 2017 | 99.7 | 99.8 | 99.7 | 99.8 | 99.7 | 99.8 | |
| | | Italy | MF805719 | 2017 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | |
| | | Serbia | MK117051 | 2019 | 99.7 | 99.9 | 99.7 | 99.9 | 99.7 | 99.9 | |
| | North America | USA | KT869077 | 2015 | 98.7 | 99.1 | 98.7 | 99.1 | 98.7 | 99.1 | |
| | | USA | KX898030 | 2016 | 98.5 | 98.8 | 98.5 | 98.8 | 98.5 | 98.8 | |
| | | USA | KX966193 | 2016 | 99.5 | 99.6 | 99.5 | 99.6 | 99.5 | 99.6 | |
| | | Mexico | MH192340 | 2017 | 99.5 | 99.8 | 99.5 | 99.8 | 99.5 | 99.8 | |
| | South America | Colombia | MH327785 | 2018 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | 99.3 | 99.5 | |
| | | Chile | MN907812 | 2019 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | 99.6 | 99.8 | |
| | | Brazil | MF079254 | 2016 | 99.6 | 99.9 | 99.6 | 99.9 | 99.6 | 99.9 | |
| | | Brazil | MF079253 | 2016 | 98.7 | 99.0 | 98.7 | 99.0 | 98.7 | 99.0 | |
| | | Brazil | MK645715 | 2018 | 99.6 | 100 | 99.6 | 100 | 99.6 | 100 | |
| | | Brazil | MK645718 | 2018 | 99.8 | 100 | 99.8 | 100 | 99.8 | 100 | |
| | | Brazil | MK645719 | 2018 | 99.8 | 100 | 99.8 | 100 | 99.8 | 100 | |
| | | Brazil | MK645716 | 2018 | 99.6 | 100 | 99.6 | 100 | 99.6 | 100 | |
| | Wild boar | Europe | Spain | MH579736 | 2005 | 99.2 | 99.5 | 99.2 | 99.5 | 99.2 | 99.5 |
| | | | Spain | MH579747 | 2018 | 98.7 | 99.3 | 98.7 | 99.3 | 98.7 | 99.3 |
| Germany | | | MK280624 | 2018 | 98.6 | 99.1 | 98.6 | 99.1 | 98.6 | 99.1 | |
| South America | | Brazil | MH699985 | 2018 | 98.7 | 98.9 | 98.7 | 98.9 | 98.7 | 98.9 | |

4. Discussion

The PCV-3 phylogenetic tree (Figure 1) showed that the PCV-3 sequences from this study were more similar to Brazilian, American, Taiwanese, Chinese and Chilean strains obtained from domestic pigs than to other PCV-3 nt sequences obtained from wild boar and available in GenBank. This result suggests that PCV-3 may circulate between Brazilian domestic and feral pigs. In addition, the notable similarity between strains from Brazilian wild boars and those obtained in different countries and years suggests the high genetic stability of PCV-3 field strains.

In this study, PCV-3 DNA was detected in 7 (10%) out of the 70 serum samples, suggesting a systemic infection. Previous studies have shown that wild boars are a potential reservoir for PCV-3 infection in wild and domestic pigs [22]. Additionally, according to Klaumann et al. (2018) [31], PCV-3 could be detected over a long time, suggesting that wild boars may exhibit long-lasting infections. Other viruses belonging to the *Circovirus* genus, such as PCV-2, also produce persistent viremia in pigs [32]. PCV-3 was reported in serum from wild boars in some countries. Italy was the first country to report PCV-3 infection in wild boars, where 33% of serum samples collected from 2014 to 2015 were positive [21]. In Spain, 42.6% of serum samples collected from wild boars from 2004 to 2018 were positive for PCV-3, demonstrating that the virus has been circulating since 2004 [22]. A longitudinal study in Spain, which involved the capture and recapture of wild boars for over a year, detected PCV-3 in serum samples of 52.6% of the evaluated animals [22].

The prevalence of PCV-3 DNA in serum samples of free-living wild boars in Brazil was lower (10%; 7/70) than that observed in European studies [21,22]. PCV-3 studies in Brazil are scarce but showed that PCV-3 has been present in domestic pigs since 2006 [4], and in wild boars since 2013 [13]. In the country, PCV-3 was previously detected in serum of sows presenting stillbirths [3] and the prevalence of PCV-3 in serum samples of domestic pigs was higher (26.7%; 41/154) [9] than observed in wild boars in our research. In a retrospective study, PCV-3 was detected in 47.8% (32/67) of different domestic pig samples such as lung, lymph nodes, and spleen; however, the prevalence for each organ was not reported [4]. A recent study by Varela et al. (2020) [13] detected PCV-3 in 36.3% (29/80) of retropharyngeal lymph nodes from wild boars captured from 2013 to 2015 in Rio Grande do Sul state; other samples types and animals age and sex were not evaluated.

Our study was the first to investigate the occurrence of PCV-3 in free-living wild boars in a specific Brazilian region (Paraná state, South Brazil), and to describe PCV-3 recovered from the serum and lungs of these species in Brazil. Selection of sample types for PCV-3 detection was based on previous studies that indicated spleen [20,22], tonsil [13,22], liver [22] and lungs [22] to be the most useful tissues for PCV-3 detection. Furthermore, lungs had the highest prevalence of positivity (57.1%) compared to other tissues [22], and they are considered as a target for PCV-3 replication [31]. Although the viral load in the submandibular lymph node was higher, the percentual of positivity in this tissue was lower compared to other tissues [22]. Serum is considered the most appropriate sample for epidemiological studies in wild boars, despite PCV-3 viral load being lower when compared with viral load found in other tissues [22]. So far, there are few published studies of PCV-3 detection in wild boars [13,20–22], and 66.6% of them use serum as biological material for initial PCV-3 investigation [21,22].

Studies published to date observed a high prevalence of PCV-3 in adult wild boars (47.5%) and a low prevalence in juveniles (8.6%) [22]. Surprisingly, in our study, PCV-3 was only detected in adult free-living wild boars, suggesting less virus circulation in juvenile free-living wild boars. Usually, adult males live alone while adult females are frequently seen in flocks with or without offspring. The lower PCV-3 detection observed in juvenile wild boars suggests a low viremia at the time of sample collection [10], possibly due to the presence of PCV-3 antibodies from maternal colostrum.

5. Conclusions

This report is the first to describe PCV-3a in free-living wild boars in Paraná state, South Brazil. The identity matrix demonstrated a high nt similarity among the three PCV-3 strains from this study and other strain sequences that are available in GenBank. PCV-3 prevalence in wild boars should be evaluated to determine the dynamics of virus evolution in this pig population.

Author Contributions: Conceptualization, T.C.G.D.d.S.; D.G. and A.A.A.; methodology, T.C.G.D.d.S.; D.G. and R.S.; writing—original draft preparation, T.C.G.D.d.S. and D.G.; writing—

review and editing, R.S.; R.A.L.; A.A.A. and G.d.S.P.; supervision, A.A.A.; T.C.G.D.d.S. and D.G. contributed equally for the elaboration of the manuscript and are first co-authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and was approved under identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are grateful to the wildlife controller agents, especially Rodrigo Menon de Souza. The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES); the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq); the Financing of Studies and Projects (FINEP); and the Araucaria Foundation (FAP/PR). A.A.A. is recipient of the CNPq Fellowship. G.d.S.P. is a recipient of the CAPES Fellowship.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Palinski, R.; Piñeyro, P.; Shang, P.; Yuan, F.; Guo, R.; Fang, Y.; Byers, E.; Hause, B.M. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01879-16, doi:10.1128/jvi.01879-16.
- Phan, T.G.; Giannitti, F.; Rossow, S.; Marthaler, D.; Knutson, T.; Li, L.; Deng, X.; Resende, T.; Vannucci, F.; Delwart, E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol. J.* **2016**, *13*, 1–8, doi:10.1186/s12985-016-0642-z.
- Tochetto, C.; Lima, D.A.; Varela, A.P.M.; Loiko, M.R.; Paim, W.P.; Scheffer, C.M.; Herpich, J.I.; Cerva, C.; Schmitd, C.; Cibulski, S.P.; et al. Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 5–9, doi:10.1111/tbed.12735.
- Saraiva, G.L.; Vidigal, P.M.P.; Assao, V.S.; Fajardo, M.L.M.; Loreto, A.N.S.; Fietto, J.L.R.; Bressan, G.C.; Lobato, Z.I.P.; de Almeida, M.R.; Silva-Júnior, A. Retrospective detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 (PCV3) strains identified between 2006 and 2007 in Brazil. *Viruses* **2019**, *11*, 201, doi:10.3390/v11030201.
- Klaumann, F.; Franzo, G.; Sohrmann, M.; Correa-Fiz, F.; Drigo, M.; Núñez, J.I.; Sibila, M.; Segalés, J. Retrospective detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in pig serum samples from Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 1290–1296, doi:10.1111/tbed.12876.
- Franzo, G.; Legnardi, M.; Hjulager, C.K.; Klaumann, F.; Larsen, L.E.; Segales, J.; Drigo, M. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 602–606, doi:10.1111/tbed.12836.
- Zhang, F.; Yuan, W.; Li, Z.; Zhang, Y.; Zeng, X.; Zhao, M.; Ye, Y.; Ding, Z.; He, H.; Wu, Q.; et al. Porcine circovirus type 3 in pig farms experiencing diarrhea in Jiangxi, China: Prevalence, genome sequence and pathogenicity. *Animals* **2020**, *10*, 2324, doi:10.3390/ani10122324.
- Tan, C.Y.; Opaskornkul, K.; Thanawongnuwech, R.; Arshad, S.S.; Hassan, L.; Ooi, P.T. First molecular detection and complete sequence analysis of porcine circovirus type 3 (PCV3) in Peninsular Malaysia. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235832, doi:10.1371/journal.pone.0235832.
- Cruz, A.C.M.; Rodrigues, I.L.F.; Souza, A.E.; Knackfuss, F.B.; Silveira, R.L.; Castro, T.X. Molecular detection and clinical aspects of porcine circovirus 3 infection in pigs from Brazil [Detecção molecular e aspectos clínicos da infecção por circovirus suíno 3 em suínos do Brasil]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2020**, *72*, 1731–1736, doi:10.1590/1678-4162-11924.
- Stadejek, T.; Woźniak, A.; Miłek, D.; Biernacka, K. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *64*, 1350–1353, doi:10.1111/tbed.12672.
- Ye, X.; Berg, M.; Fossum, C.; Wallgren, P.; Blomström, A.L. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus Genes* **2018**, *54*, 466–469, doi:10.1007/s11262-018-1553-4.
- Sun, J.; Wei, L.; Lu, Z.; Mi, S.; Bao, F.; Guo, H.; Tu, C.; Zhu, Y.; Gong, W. Retrospective study of porcine circovirus 3 infection in China. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 607–613, doi:10.1111/tbed.12853.
- Varela, A.P.M.; Loiko, M.R.; Andrade, J. da S.; Tochetto, C.; Cibulski, S.P.; Lima, D.A.; Weber, M.N.; Roehe, P.M.; Mayer, F.Q. Complete genome characterization of porcine circovirus 3 recovered from wild boars in Southern Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 240–247, doi:10.1111/tbed.13679.
- Zheng, S.; Wu, X.; Zhang, L.; Xin, C.; Liu, Y.; Shi, J.; Peng, Z.; Xu, S.; Fu, F.; Yu, J.; et al. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *64*, 1337–1341, doi:10.1111/tbed.12667.

15. Saraiva, G.L.; Vidigal, P.M.P.; Fietto, J.L.R.; Bressan, G.C.; Silva Júnior, A.; de Almeida, M.R. Evolutionary analysis of Porcine circovirus 3 (PCV3) indicates an ancient origin for its current strains and a worldwide dispersion. *Virus Genes* **2018**, *54*, 376–384, doi:10.1007/s11262-018-1545-4.
16. Franzo, G.; Delwart, E.; Fux, R.; Hause, B.; Su, S.; Zhou, J.Y.; Segalés, J. Genotyping porcine circovirus 3 (PCV-3) Nowadays: Does it make sense? *Viruses* **2020**, *12*, 265, doi:10.3390/v12030265.
17. Sun, W.; Wang, W.; Xin, J.; Cao, L.; Zhuang, X.; Zhang, C.; Zhu, Y.; Zhang, H.; Qin, Y.; Du, Q.; et al. An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in dogs in the Guangxi Province from 2015 to 2017, China. *Virus Res.* **2019**, *270*, 1–8, doi:10.1016/j.virusres.2019.197663.
18. Li, Y.; Ma, Z.; Liu, M.; Cao, L.; Zhang, J.; Jiao, Q.; Meng, F.; Tong, Z.; Hu, S.; Jiang, Z.; et al. Porcine circovirus 3 in cattle in Shandong province of China: A retrospective study from 2011 to 2018. *Vet. Microbiol.* **2020**, *248*, 108824, doi:10.1016/j.vetmic.2020.108824.
19. Franzo, G.; Grassi, L.; Tucciarone, C.M.; Drigo, M.; Martini, M.; Pasotto, D.; Mondin, A.; Menandro, M.L. A wild circulation: High presence of Porcine circovirus 3 in different mammalian wild hosts and ticks. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1548–1557, doi:10.1111/tbed.13180.
20. Prinz, C.; Stillfried, M.; Neubert, L.K.; Denner, J. Detection of PCV3 in German wild boars. *Virol. J.* **2019**, *16*, 1–7, doi:10.1186/s12985-019-1133-9.
21. Franzo, G.; Tucciarone, C.M.; Drigo, M.; Cecchinato, M.; Martini, M.; Mondin, A.; Menandro, M.L. First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 957–962, doi:10.1111/tbed.12905.
22. Klaumann, F.; Dias-Alves, A.; Cabezón, O.; Mentaberre, G.; Castillo-Contreras, R.; López-Béjar, M.; Casas-Díaz, E.; Sibila, M.; Correa-Fiz, F.; Segalés, J. Porcine circovirus 3 is highly prevalent in serum and tissues and may persistently infect wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 91–101, doi:10.1111/tbed.12988.
23. ABPA. *Brazilian Association of Animal Protein, Annual report 2020*; São Paulo, SP, Brazil, 2020. Available online: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/06/abpa_relatorio_anual_2020_ingles_versao_web.pdf. Accessed 18 May 2020.
24. Pedrosa, F.; Salerno, R.; Padilha, F.V.B.; Galetti, M. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: Economic impacts and ecological uncertainty. *Nat. Conserv.* **2015**, *13*, 84–87, doi:10.1016/j.ncon.2015.04.005.
25. Hebeisen, C.; Fattebert, J.; Baubet, E.; Fischer, C. Estimating wild boar (*Sus scrofa*) abundance and density using capture-resights in Canton of Geneva, Switzerland. *Eur. J. Wildl. Res.* **2008**, *54*, 391–401, doi:10.1007/s10344-007-0156-5.
26. IBAMA *Instrução Normativa Número 3 de 31 de Janeiro de 2013 do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Plano Nacional de Preservação, Controle e Monitoramento do Javali*; Brasília, Brazil 2013. Available online: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70006375/do1-2019-04-04-instrucao-normativa-n-12-de-25-de-marco-de-2019-70006233. Accessed May 18 2020
27. Ewing, B.; Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **1998**, *8*, 186–194, doi:10.1101/gr.8.3.186.
28. Chou, H.; Holmes, M.H. DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 1093–1104.
29. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729, doi:10.1093/molbev/mst197.
30. Hall, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
31. Klaumann, F.; Correa-Fiz, F.; Franzo, G.; Sibila, M.; Núñez, J.I.; Segalés, J. Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Front. Vet. Sci.* **2018**, *5*, 315, doi:10.3389/fvets.2018.00315.
32. Opriessnig, T.; Karuppannan, A.K.; Castro, A.M.M.G.; Xiao, C.T. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. *Virus Res.* **2020**, *286*, 198044, doi:10.1016/j.virusres.2020.198044.

1383 **7 ARTIGO B – *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN FREE-LIVING WILD**
1384 **BOARS IN PARANÁ, BRAZIL (DOI 10.1007/S42770-021-00516-0)**



Mycoplasma hyopneumoniae in free-living wild boars in Paraná, Brazil

Tatiana C. G. D. de Souza¹ · Virgínia Santiago Silva² · Marcos A. Z. Mores² · Beatris Kramer² · Raquel Arruda Leme¹ · Gisele da Silva Porto¹ · Amauri Alcindo Alfieri¹

Received: 18 November 2020 / Accepted: 27 April 2021
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

This is the first study conducted in Paraná, Brazil, to investigate *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) infection in free-living wild boars. Eighty-eight wild boars were managed by authorized controllers between 2017 and 2019 in the state of Paraná in southern Brazil. Management georeferencing, sex, and weight were recorded for each animal. The presence of Mhyo antibodies in wild boar serum samples was evaluated using a commercial indirect ELISA kit. The presence of enzootic pneumonia-like gross lesions was evaluated, and the observed macroscopic lesions were subjected to immunohistochemistry (IHC). The Chi-square test and the intensity of the association with the odds ratio and 95% confidence interval were used to evaluate the differences in the qualitative variables between groups (sex and municipality). Juvenile wild boars exhibited a higher seroprevalence than older ones ($p=0.005$). The Teixeira Soares municipality differed in Mhyo seroprevalence in comparison with Castro ($p<0.001$), Ponta Grossa ($p=0.004$), and Carambeí ($p<0.001$). Females were 6.79 times more likely to present consolidation lesions than males ($p=0.004$). Among the evaluated lung samples with injuries, 57.1% (8/14) and 53.8% (7/13) were Mhyo positive by IHC in Castro and Ponta Grossa, respectively, confirming that the identified macroscopic lesions were caused by Mhyo. This study demonstrates the circulation of Mhyo in free-living wild boars, which raises concerns regarding the epidemiological role of this animal species for the spread of the pathogen.

Keywords ELISA · Immunohistochemistry · Enzootic pneumonia · Mycoplasmosis · Pulmonary consolidation · Swine

Introduction

Enzootic pneumonia (EP) is a chronic disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo). The disease affects both domestic pigs and wild boars and is responsible for important economic losses in the pig producer system worldwide. For instance, the Mhyo-associated additional costs in the USA are estimated at US\$2.50 per pig in the grower-to-finish stage, with therapeutics accounting for increases of US\$0.75–US\$0.90 per pig [1]. Brazil is the fourth largest pork producer and exporter worldwide, and the state of Paraná has the second largest production in the country, with 19.85%

of the total pork meat production in 2019 [2]. Although EP cost-based studies are scarce in Brazil, there are records of US\$49,400 extra expenses over 4 months in a farrow-to-finish pig herd contaminated with Mhyo [3].

Wild boars are the result of crossbreeding between boars (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). The total population of free-living wild boars in Brazil is unknown, but they are frequently seen in the crop fields and near livestock farms of different regions of Brazil, including the municipalities of Castro, Carambeí, Ponta Grossa, and Teixeira Soares in the state of Paraná [4]. Evidence of Mhyo infections have been reported in wild boars in Spain [5, 6], Slovenia [7], Catalonia [8], Italy [9], Russia [10], France [11], and Brazil [12] and also in captive wild boars in Brazil [13].

However, to the knowledge of the authors, there are no Brazilian studies based on Mhyo infection in free-living wild boars.

The health status of pig herds is essential in terms of the maintenance and growth of pork production and exports, and there is evidence that domestic pigs and wild

Responsible editor: Mariana X Byndloss

✉ Amauri Alcindo Alfieri
alfieri@uel.br

¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

² Embrapa Suínos E Aves, Concórdia, SC 89700-000, Brazil

boars share vulnerabilities in certain viral and bacterial pathogen infections [8, 9, 11, 14]. It is known that Mhyo can be disseminated by air within a 9.2-km radius [15]. Therefore, knowing the health status of free-living wild boars regarding this pathogen is essential for the biosecurity of pork production. This study aimed to investigate antibodies against Mhyo by ELISA test of serum samples of free-living wild boars. Additionally, the presence of EP-like gross lesions in lungs and their association with the presence of Mhyo are based on the immunohistochemistry (IHC) assay.

Materials and methods

Sample collection

The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and was approved under identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

A total of 88 free-living wild boars were managed in the municipalities of Castro, Carambeí, Ponta Grossa, and Teixeira Soares in the state of Paraná from January 2017 to January 2019. The management was performed by exotic wildlife controller agents authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) registered in the Federal Technical Register of Potentially Pollutive Activity (CTF/APP) and closely monitored by the Brazilian Army regarding the use of firearms in field activities [16]. The georeferencing of management, sex, and age were individually recorded (Table 1). Individuals were considered “juveniles” when they weighed 20 to 40 kg and reddish coat and “adults” when they weighed > 60 kg and black or silver coat [17]. Other ranges of weight and coat color were not considered

because only animals within the mentioned parameters were managed.

Serology and immunohistochemistry

Serum and lung samples from all animals were analyzed. The presence of anti-Mhyo antibodies in the wild boar's sera was investigated using a commercial indirect ELISA kit (Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA) following the manufacturer's instructions. Other serological tests were performed to investigate antibodies against influenza A virus (IAV) with AI MultiS-Screen Antibody Test (Idexx Laboratories, Montpellier, France) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) also by ELISA test (Idexx Apx IV, Westbrook, ME, USA).

The presence of EP-like gross lesions in lung tissue fragments was assessed according to Garcia-Morante et al. [18]. Lung tissues that presented macroscopic lesions were further submitted to an IHC test that specifically identifies the presence of Mhyo and is used as a confirmatory test in the routine diagnosis of enzootic pneumonia [19, 20].

The IHC was standardized by the streptavidin–biotin–peroxidase method with a commercial kit LSAB® + System – HRP—DakoCytomation® (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and using a polyclonal antibody against the P36 protein of Mhyo [21]. Stocked pig lung fragments, with and without lesions, were used as positive and negative controls, respectively.

Statistical analysis

The influence of sex, age, and the city of management in the seroprevalence of Mhyo in the free-living wild boars was analyzed through a generalized linear statistical model with binomial distributions. Initially, a descriptive analysis of the data was performed with mean, median, standard deviation, interquartile range, and minimum and maximum values of the weight variable. For the qualitative variables, descriptive analyses were also carried out with estimates of simple and relative frequencies. Then, the non-parametric approach was used to analyze the weight since it did not present a normal distribution in the Shapiro–Wilk test ($p < 0.05$). The Mann–Whitney U test was used to evaluate the difference between the tests according to weight. The Chi-square test and the intensity of the association with the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were used to evaluate the differences in the qualitative variables (sex and municipality) between groups. The tests were considered significant when $p < 0.05$, and the analyses were performed in SPSS 21.0 [22].

Table 1 Number of wild boars managed in the municipalities of Castro, Carambeí, Ponta Grossa, and Teixeira Soares in Paraná state, according to municipality, sex, and age classification

| Municipality | Age classification | | | | Total |
|-----------------|--------------------|-------|----------|-------|-------|
| | Female | | Male | | |
| | Juvenile | Adult | Juvenile | Adult | |
| Carambeí | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| Castro | 9 | 24 | 9 | 9 | 51 |
| Ponta Grossa | 0 | 14 | 0 | 4 | 18 |
| Teixeira Soares | 3 | 5 | 4 | 4 | 16 |
| Total | 14 | 43 | 14 | 17 | 88 |

Results

The serological results are summarized in Table 2. Antibodies against Mhyo were detected in 58 (65.9%) of the 88 serum samples analyzed. Juvenile wild boars had a higher seroprevalence (71%, 20/28) for Mhyo than the adults (63.3%, 38/60) ($p = 0.005$). Meanwhile, there were no significant ($p = 0.333$) differences in the detection of anti-Mhyo antibodies in males (58%, 18/31) and female (70%, 40/57) animals. The municipalities of Castro, Carambeí, and Ponta Grossa did not differ in terms of the seropositive prevalence ($p > 0.005$). However, the municipality of Teixeira Soares significantly differed from Castro ($p < 0.001$), Ponta Grossa ($p = 0.004$), and Carambeí ($p < 0.001$). Figure 1 shows the results according to the geographical area where the wild boars were managed. Among the other respiratory pathogens investigated antibodies for App (11.4%, 10/88) and IAV (17%, 15/88), although none of the Mhyo-positive wild boars was positive for either App or IAV.

Only adult animals from the municipalities of Castro (51.5%, 17/33) and Ponta Grossa (55.5%, 10/18) presented some degree of pulmonary consolidation (Fig. 2), with no significant difference between these municipalities ($p = 0.102$). According to sex, EP-like gross lesions were found in adult females of Castro (58.3%, 14/24) and Ponta Grossa (71%, 10/14) and male animals of Castro (33%, 3/9), showing that females were 6.79 times (IC 95% 1.85–24.95) more likely to have lung consolidation than males ($p = 0.004$). Out of the animals that presented lung consolidation, only two adult females from Ponta Grossa and one male from Castro were seronegative for Mhyo.

Paired lung samples from the 27 adult animals that presented consolidation were subjected to IHC, and only two adult females from Ponta Grossa and Castro were negative for Mhyo. Among these animals, IHC-positive

results were detected in adult females from Castro (57.1%, 8/14) and Ponta Grossa (50%, 5/10) and males from Castro (67%, 2/3). The IHC results did not differ according to the municipalities ($p = 0.656$) and sex ($p = 0.684$). Mhyo antigens were observed on the surfaces of epithelial cells (Fig. 3).

Discussion

This is the first study to investigate anti-Mhyo antibodies associated with pathological and IHC findings in free-living wild boars in Brazil. However, a previous Brazilian study described the occurrence of Mhyo in captive wild boars, in which it was observed that 76% (19/25) of lungs were positive by IHC, although anti-Mhyo antibodies were not evaluated, and the age of the positive animals was not mentioned [13]. In another Brazilian study with wild boars, 19.7% (12/61) of the animals were seropositive, and 1.7% of the evaluated lungs presented lesions suggestive of bacterial pneumonia; however, IHC for Mhyo was not performed [12].

In the present survey, IHC was included because this technique allows the identification of Mhyo antigens in the microscopic lesions indicating the bacterial replication and confirming the action of this pathogen in pneumonia development [19]. Additionally, IHC is a lower-cost technique, easier to be performed, and widely used as a confirmatory method for Mhyo diagnosis [19, 20].

Through the indirect ELISA technique, the lower seroprevalence of Mhyo has been reported in wild boars in Spain (13.94%) [5], Slovenia (14.84%) [7], and Italy (30%) [9]. Chiari et al. [9] observed a higher prevalence in juvenile free-living wild boars when compared to adult animals in Italy, corroborating the present study.

Wild boars present an aggregate behavior; the females are usually seen in flocks with or without offspring, and the

Table 2 Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae*-seropositive wild boars in the municipalities of Castro, Carambeí, Ponta Grossa, and Teixeira Soares in Paraná state according to municipality, sex, and age classification

| Municipality | Serology Positive/total tests (%) | | | | | | Total (%) |
|-----------------|--------------------------------------|--------------|--|--------------|-------------|---|----------------|
| | Female | | | Male | | | |
| | Juvenile | Adult | Total | Juvenile | Adult | Total | |
| Carambeí | 2/2 | 0 | 2/2 | 1/1 | 0 | 1/1 | 3/3 (100) a |
| Castro | 7/9 | 19/24 | 26/33 | 9/9 | 5/9 | 14/18 | 40/51 (78.4) a |
| Ponta Grossa | 0 | 11/14 | 11/14 | 0 | 1/4 | 1/4 | 12/18 (66.7) a |
| Teixeira Soares | 0/3 | 1/5 | 1/8 | 1/4 | 1/4 | 2/8 | 3/16 (18.8) b |
| Total | 9/14 (64.3) | 31/43 (72.1) | 40/57 (70) ^A (70.2) ^A | 11/14 (78.6) | 7/17 (41.2) | 18/31(58) ^A (58.1) ^A | 58/88 (65.9) |

Note: Lowercase letters refer to comparison among the municipalities. Capital letters refer to comparisons between sex. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$)

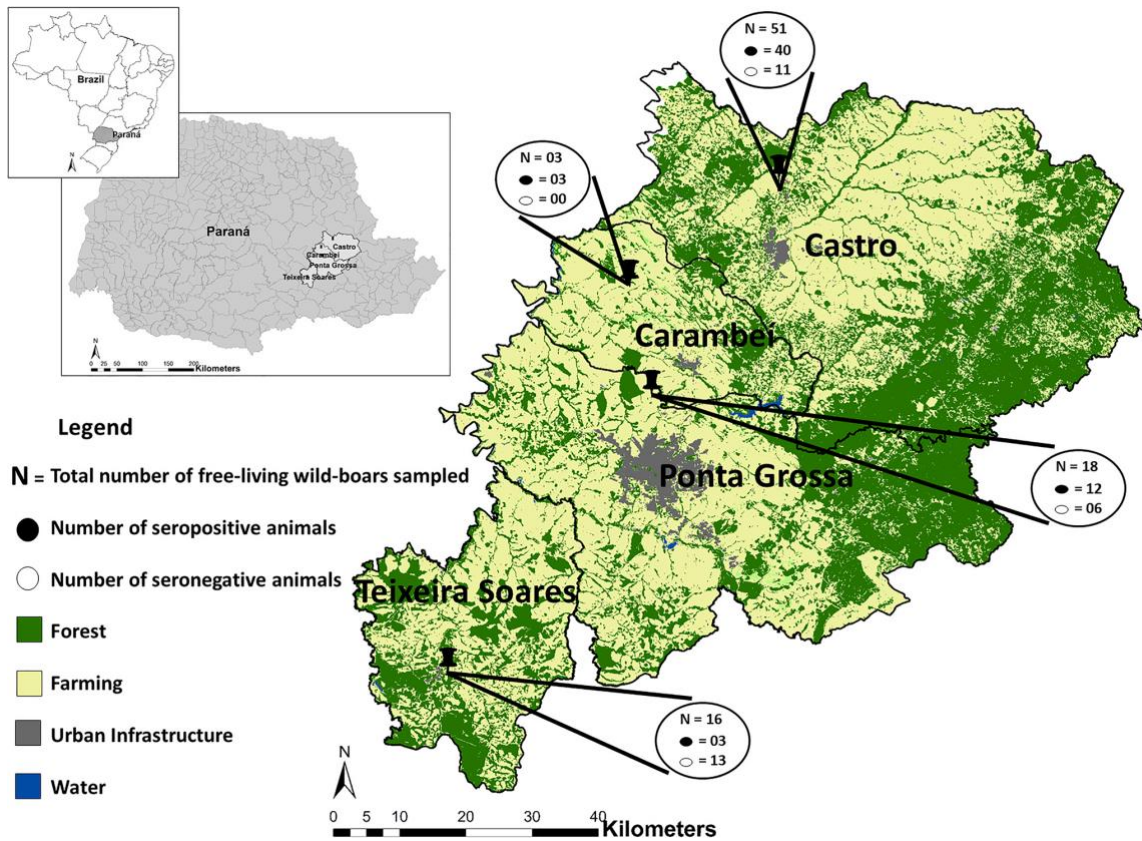


Fig. 1 Geographical sampling points of free-living boars. The map shows the distance among the different municipalities, landscape features, and Mhyo serological results for each sampled area, Paraná state, southern Brazil

males are found isolated. This greater contact between the females may explain the higher seroprevalence and lung lesions in this group due to the greater contact with the agent, which is orally disseminated. Additionally, females can excrete Mhyo after delivering, increasing the transmission of the agent [23].

In commercial pigs, juveniles animals can be infected with Mhyo either by their mothers, as they can excrete the agent at birth or, more commonly, after weaning, which is the phase at which the animals have the highest contact between different litters [23]. Infected piglets remain seropositive for long periods, and as adults, if they are not exposed to the agent again, they can become seronegative. Thus, the serological profile observed in the wild boars of the present study is comparable to the one observed in commercial pig herds, as it presents a higher seroprevalence of Mhyo in juvenile animals.

Considering that Mhyo can infect nearby farms [15] and the capacity for a territorial invasion of free-living wild boars, it is suggested that this pathogen can be shared by

commercial herds and wild boars [24]. In our study, the incidence of anti-Mhyo antibodies-positive animals is higher in the municipalities where there is a higher concentration of commercial domestic pig farms (Castro, Carambeí, and Ponta Grossa). The municipalities of Castro, Carambeí, Ponta Grossa, and Teixeira Soares have a pig herd of 276,797, 112,243, 26,382, and 19,913 animals, respectively [25]. Air Mhyo transmission between distant pig farms [6, 15] has been reported in areas of high pig density [24]. Meanwhile, the circulation of Mhyo is smaller and slower in low pig densities [24, 26]. A study conducted in Switzerland showed that wild boars from the northern region of the country, which has a high density of domestic pigs and wild boars and reports of Mhyo outbreaks, were found positive for Mhyo in both lungs and nasal swabs and presented lung consolidation lesions. In contrast, the same study showed that there were no outbreaks of Mhyo in commercial herds in the southern region of Switzerland, which has low boar density [24]. Free-living wild boars live in small groups, with a low density of animals, suggesting that these individuals

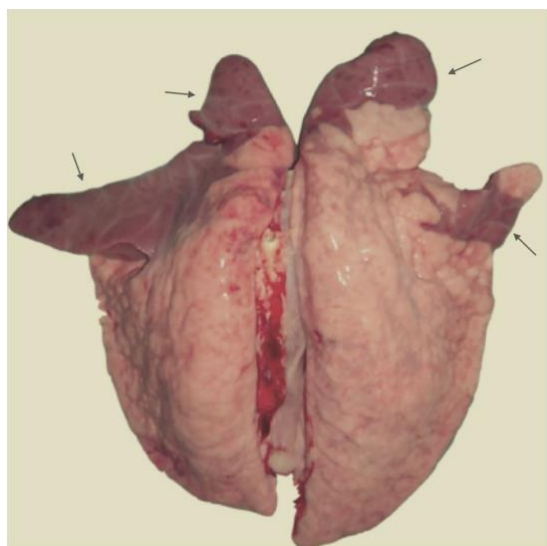


Fig. 2 Adult female free-living wild boar lung positive for *M. hyopneumoniae* managed in Castro/PR. Consolidated and depressed areas with dark red color (arrowhead) in the cranial and apical lobes compared to normal pulmonary parenchyma

are less susceptible to EP than domestic pigs. However, wild boars can share pathogens with pigs through direct or indirect contact with Mhyo-positive commercial herds.

Mhyo produces pulmonary consolidation in pigs [23] and is more commonly seen in older animals on commercial farms [6, 24]. Lung consolidation has been observed in 43% (43/99) of wild boars in Italy, and the juvenile animals had more EP-like lesions than the others [9]. Our study found a higher prevalence of pulmonary consolidation in adult animals, such as domestic swine, and females were more likely to have these lesions, possibly because they are more likely to aggregate and care for the juveniles.

IHC is used to confirm the presence of Mhyo in the lungs of animals affected by EP [18]. A previous study reported a high frequency of Mhyo IHC-positive wild boars in Brazil [13]. However, the authors only analyzed a captive population, while in the present study, free-living wild boars were evaluated. The municipality of Carambeí had only three animals sampled, and all of them were seropositive; however, these animals did not show lung consolidation. It is known that pigs seroconvert 21–38 days after Mhyo infection [27]. In contrast, pulmonary lesions by Mhyo are evidenced with less than 21 days of infection and can be confirmed with the presence of the agent through IHC at early infection [23]. Based on this knowledge, we hypothesize that the animals from Carambeí may have been exposed to Mhyo weeks before the collection of the samples, causing

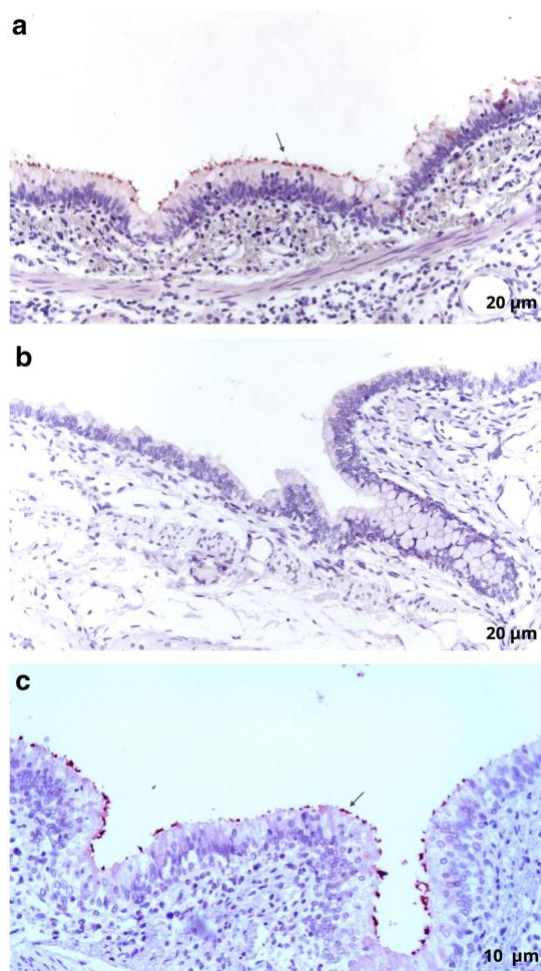


Fig. 3 **a** Positive control: fragments of lungs from pig-specific pathogens free (SPF) experimentally inoculated with Mhyo and with infection confirmed by nested-PCR. Bar, 20 µm. **b** Negative control: fragments of lungs of SPF pig also evaluated by n-PCR. Bar, 20 µm. **c** Immunohistochemistry for Mhyo antigen detection with immunoreactivity on the surface (arrowhead) of bronchial epithelial cells of a wild boar. Bar, 10 µm

lung lesions to heal, and these were not diagnosed at macroscopy. Another possibility is that these animals may have become infected, developed antibodies, and had no macroscopic lesions since EP is a multifactorial disease. The non-detection of Mhyo by IHC does not rule out the possibility that it may be the cause of the consolidation since the agent is only found in the lungs at the beginning of the infection. The limited number of sampled animals from this specific area needs to be taken with caution.

Conclusions

The free-living wild boars evaluated in this study were managed in the geographical region with a high density of commercial pig in Paraná state in southern Brazil. The serological, pathological, and IHC findings reported herein reveal a high prevalence of Mhyo in the free-living wild boar population in this area and raise concerns regarding the epidemiological role of this animal species for the spread of this pathogen.

Acknowledgments The authors are grateful to the wildlife controller agents, especially Rodrigo Menon de Souza.

Authors' contributions Conceptualization: T.C.G.D.S and A.A.A. Methodology: T.C.G.D.S, V.S.S., M.A.Z.M., and B.K. Writing, original draft preparation: T.C.G.D.S. Writing, review and editing: R.A.L, A.A.A, V.S.S., M.A.Z.M., B.K., and G.S.P. Supervision: A.A.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding The authors thank the following Brazilian Institutes for the financial support: the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES); the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq); the Financing of Studies and Projects (FINEP); and the Araucaria Foundation (FAP/PR). A.A. Alfieri is a recipient of a CNPq fellowship. G.S. Porto is a recipient of a CAPES fellowship.

Declarations

Ethics approval The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and was approved under identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Schwartz M (2015) The cost of *Mycoplasma hyopneumoniae* in growing pigs. In Proceedings of the Leman Swine Conference. Saint Paul. Available online: <http://www.swinecast.com/dmark-schwartz-cost-of-mycoplasma-hyopneumoniae-in-growing-pigs>. Accessed on May 18 2020
- ABPA Brazilian Association of Animal Protein (2020) Annual report. Available online: http://abpabr.org/wpcontent/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portuguese_web.pdf. Accessed 18 May 2020
- Sales T, Soares P, Brito W, Linhares D, Lucena M, Curado P, Sobestiansky J (2010) Cost *Mycoplasma hyopneumoniae* outbreaks in Brazil. Vancouver
- Pedrosa F, Salerno R, Padilha FVB, Galetti M (2015) Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: Economic impacts and ecological uncertainty. *Nat e Conserv* 13:84–87. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2015.04.005>
- Risco D, Serrano E, Fernández-Llario P, Cuesta JM, Gonçalves P, Garcia-Jiménez WL, Martínez R, Cerrato R, Velarde R, Gómez L, et al (2014) Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111011>
- Sibila M, Mentaberre G, Boadella M, Huerta E, Casas-Díaz E, Vicente J, Gortázar C, Marco I, Lavín S, Segalés J (2010) Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. *Vet Microbiol* 144:214–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.019>
- Štukelj M, Toplak I, Vengušt G (2014) Prevalence of antibodies against selected pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. *Slov Vet Res* 51:21–28
- Closa-Sebastià F, Casas-Díaz E, Cuenca R, Lavín S, Mentaberre G, Marco I (2011) Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *Eur J Wildl Res* 57:977–981. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0491-9>
- Chiari M, Ferrari N, Zanoni M, Alborali L (2014) *Mycoplasma hyopneumoniae* temporal trends of infection and pathological effects in wild boar populations. *Eur J Wildl Res* 60:187–192. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0763-2>
- Kukushkin S, Baborenko E, Baybikov T, Mikhailishin V, Domskiy I (2009) Seroprevalence of antibodies to main porcine infectious pathogens in wild boar in some regions of Russia. *Acta Silv. Lignaria Hungarica* an Int. J. For. Wood Environ Sci 5: 147–152. Available online: http://aslh.nymc.hu/fileadmin/dokumentumok/fmk/acta_silvatica/cikkek/Vol05-2009/12_kukushkin_et_al.pdf. Accessed on May 31 2020
- Marois C, Tocqueville V, Le Potier M, Hars J, Kobisch M (2006) Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in French wild boars. Copenhagen
- Severo DRT, Werlang RA, Mori AP, Baldi KRA, Mendes RE, Surian SRS, Coldebella A, Kramer B, Trevisol IM, Gomes TMA, Silva VS (2020) Health profile of free-range wild boar (*Sus scrofa*) subpopulations hunted in Santa Catarina State Brazil. *Transbound Emerg Dis* 00:1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.13752>
- Ecco R, Lazzari AM, Guedes RMC (2009) Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). *Pesqui Vet Bras* 29:461–468. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000600004>
- Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J (2009) Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* 181:221–231. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020>
- Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J (2010) Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* 145:198–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.028>
- BAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis Decreta a nocividade do Javali e dispõe sobre o seu manejo e controle; Brasília (2019) Available online: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70006375/do1-2019-04-04-instrucao-normativa-n-12-de-25-de-marco-de-2019-70006233. Accessed May 18 2020
- Hebeisen C, Fattebert J, Baubet E, Fischer C (2008) Estimating wild boar (*Sus scrofa*) abundance and density using capture-resights in Canton of Geneva Switzerland. *Eur J Wildl Res* 54:391–401. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0156-5>
- García-Morante B, Segalés J, Fraile L, Pérez de Rozas A, Maiti H, Coll T, Sibila M (2016) Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: A Comparative Review. *J Comp Pathol* 154: 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.11.003>
- Pieters MG, Maes D (2019) Mycoplasmosis. In: Diseases of Swine Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ,

- Stevenson GW and Zhang J (eds), 11 edn. Iowa, pp 863- 883. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch56>
20. Olaniyi MO, Ajayi OL, Alaka OO, Mustapha OA, Brown CC, Shields JP, Ard MB, Nagy T (2020) Immunohistochemical and ultrastructural studies of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain in naturally infected pigs in Nigeria. *Folia Vet* 64(1):1–10. <https://doi.org/10.2478/fv-2020-0001>
 21. de Castro LA, Schuck D, Mores N, Zaha A, Ferreira HB, Driemeier D (2009) Monospecific polyclonal antibodies for immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine pneumonic lungs. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 336–337. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.269>
 22. BM corp (2012) IBM SPSS Statistics for Windows
 23. Garcia-Morante B, Segalés J, Fraile L, Llardén G, Coll T, Sibila M (2017) Potential use of local and systemic humoral immune response parameters to forecast *Mycoplasma hyopneumoniae* associated lung lesions. *PLoS ONE* 12:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175034>
 24. Linhares MB, Belloy L, Origi FC, Lechner I, Segner H, Rysler-Degiorgis MP (2015) Investigating the role of free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in the re-emergence of enzootic pneumonia in domestic pig herds: A pathological, prevalence and risk-factor study. *PLoS ONE* 10:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119060>
 25. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Agricultural census 2017 (2017) Available online:http://www.in.gov.br/materia/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70006375/doi-10.1016/j.vetimm.2008.10.269. Accessed on May 18 2020
 26. Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz Á, Jensen JC (2004) Dynamics on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can J Vet Res* 68:12–18
 27. Neto JCG, Strait EL, Raymond M, Ramirez A, Minion FC (2014) Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. *Vet Microbiol* 174: 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.008>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1385 **CONCLUSÕES**

1386

1387 • Infecções por circovírus suíno 3 e por *Mycoplasma hyopneumoniae* estão presentes e
1388 são de ocorrência endêmica em rebanhos de suínos asselvajados de vida livre na região dos
1389 Campos Gerais, PR que é considerada uma importante região suinícola brasileira.

1390

1391 • As cepas de PCV-3 identificadas neste estudo apresentaram alta identidade de nt e
1392 similaridade de aa com outras cepas desse vírus identificadas em suínos domésticos e
1393 asselvajados no Brasil e em outros países do mundo.

1394

1395 • Análises sorológicas, patológicas e por imuno-histoquímica demonstram que o
1396 *Mycoplasma hyopneumoniae* é agente etiológico de pneumonia enzoótica em suínos
1397 asselvajados de vida livre na região do estado do Paraná incluída neste estudo.

1398

1399 • Suínos asselvajados jovens possuem maior soroprevalência para *Mycoplasma*
1400 *hyopneumoniae* comparado aos animais adultos.

1401

1402 • Suínos asselvajados fêmeas apresentam maior taxa de soroconversão e de hepatização
1403 pulmonar comparadas aos animais machos.

APÊNDICE

APÊNDICE A

PCV-3 Sequências Genômicas

1685
1686
1687
1688

1689

1690

1691 **Strain: MT075517_Brazil_2017_Wild_Boar**

1692

1693 GGATGATTTTTATGGGTGGGTCCATTTGATGAATTGCTGAGAATTGGGGACAGGTACCC

1694 TCTGAGGGTTCCTGTTAAGGGTGGGTTTGTAAATTTTGTGGCTAAGGTATTATATATTAC

1695 TAGTAATGTTGTACCGGAGGAGTGGTATTCATCGGAGAATATTCGTGGAAAGTTGGAGGC

1696 CTTGTTTAGGAGGTTCACTAAGGTTGTTTGTGGGGGGAGGGGGGGTAAAGAAAGACAT

1697 GGAGACAGTGTATCCAATAAACTATTGAGTTTATTTGCACTTGTGTACAATTATTGCGTT

1698 GGGGTGGGGTATTTATTGGGTGGGTGGGTGGGCAGCCCCCTAGCCACGGCTTGTGCCCC

1699 CCACCGAAGCATGTGGGGGATGGGGTCCCCACATGCGAGGGCGTTTACCTGTGCCCGCAC

1700 CCGAAGCGCAGCGGGAGCGCGCGGAGGGGACACGGCTTGTGCCACCGGAGGGGTGAGA

1701 TTTATATTTATTTTCACTTAGAGAACGGACTTGTAACGAATCCAAACTTCTTTGGTGCCG

1702 TAGAAGTCTGTCATTCCAGTTTTTTCCGGGACATAAATGCTCCAAAGCAGTGTCTCCCAT

1703 TGAACGGTGGGGTTCATATGTGTTGAGCCATGGGGTGGGTCTGGAGAAAAAGAAGAGGCTT

1704 TGTCTGGGTGAGCGCTGGTAGTTCCCGCCAGAATTGGTTTGGGGGTGAAGTAACGGCTG

1705 TGTTTTTTTTTAGAAGTCATAACTTTACGAGTGGAACTTTCCGCATAAGGGTTCGTCTTG

1706 AGCCAAGTGTGTTGTGGTCCAGGCGCCGTCTAGATCTATGGCTGTGTGCCCGAACATGGTT

1707 TTTGTTTGCTGAGCCGGAGAAATTACAGGGCTGAGTGTAACCTTTCATCTTTAGTATCTTA

1708 TAATATTCAAAGCTAATCGCAGTTTCCCATTCGTTTAGGCGGGTAATGAAGTGGTTGGCG

1709 TGCCAGGGCTTGTATTCTGAGGGGTCCAACGGAAATGACGTTTCATGGTGGAGTATTTTC

1710 TTTGTGTAGTATGTGCCAGCTGTGGCCCTCCTAATGAATAGTTTTCTTCTGACATAGCGC

1711 CTTCTGTGGCGTCGTCTCCTTGGGCGGGGTCTTCTTCTGAATATAGCTCTGTGTCTC

1712 ATTTTGGTGCCGGGCTAGTATTACCCGGCACCTCGGAACCCGGATCCACGGAGGTCTGTA

1713 GGGAGAAAAAGTGGTATCCCATTTATGGATGCTCCGCACCGTGTGAGTGGATATACCGGGC

1714 AGTGGATGATGAAGCGCCTCGTGTGTTTGTATGCCGCAGGACGGGGACTGGATAACTGAAT

1715 TTTTGTGGTGCTACGAGTGTCTGAAGATAAGGACTTTTATTGTCATCCTATTCTAGGTC

1716 CGGAGGGAAAGCCCGAAACACAGGTGGTGTGTTTACGATAAAACAACTGGACCCCGACCGAG

1717 TGGGAATCTATTGTGGAGTGTGGAGGCAGTATAGCGAGATACCTTATTATCGGCAAAGAG

1718 GTTGGAAAAAGCGGTACCCACACTTGCAAGGGTACGTGAATTTCAAGAACAAAAGGCGA

1719 CTCAGCTCGGTGAAGCGCTTACCCGGATTTGGTCCGGCCCATCTGGAGCCGGCGAGGGGG

1720 AGCCACAAAGAGGCCAGCGAGTATTGCAAGAAAGAGGGGGATTACCTCGAGATTGGCGAA

1721 GATTCCCTCTTCGGGTACCAGATCGGATCTTCAAGCAGCAGCTCGGATTCTGACGGAGACG

1722 GCGGGAAATCTGACTGAAGTTGCGGAGAAGATGCCTGCAGTATTTATACGCTATGGGCGG

1723 GGTTTGCCTGATTTTTGCGGGGTGATGGGGTTGGGTAAACCGCGTGATTTTAAACTGAA

1724 GTTTATGTTTTTATTGGTCTCCAGGTTGCGGGAAAACCGGGGAAGCTTGTGCGGATGCG

1725 GCTGCGCGGAATTGCAGTTGTATTTCAAGCCACGGGGCCTTGGTGGGATGGTTATAAT

1726 GGGGAGGGTGTGTTATTCT

1727 **Strain: MT075518_Brazil_2017_Wild_Boar**

1728
1729 TCAGAGGGTACCTGTCCCCAATTCTCAGCAATTCATCAAATGGAACCCACCCATAAAAAAT
1730 CATCCAGAATAACAGCACCCCTCCCCATTATAACCATCCCACCAAGGCCCCCGTGGCTTGA
1731 AATACAACCTGCAATTCCCGCGCAGCCGCATCCGCACAAGCTTCCCGCGTTTTCCCGCAAC
1732 CTGGAGGACCAATAAAAAACATAAACTTCAGTTTTAAAATCACGCGGTTTACCCAACCCCA
1733 TCACCCCGCAAAAATCACGCAAACCCCGCCCATAGCGTATAAATACTGCAGGCATCTTCT
1734 CCGCAACTTCAGTCAGATTTCCCGCCGTCTCCGTCAGAATCCGAGCTGCTGCTTGAAGAT
1735 CCGATCTGGTACCCGAAGAGGAATCTTCGCCAATCTCGAGGTAATCCCCCTCTTTCTTGC
1736 AATACTCGCTGGCCTCTTTGTGGCTCCCCCTCGCCGGTCCAGATGGGCCCGACCAAATC
1737 CGGGTAAGCGCTTCACCGAGCTGAGTCGCCTTTTGTCTTGAATTCACGTACCCTTGCA
1738 AGTGTGGGGTACCGCTTTTTTCCAACCTCTTTGCCGATAATAAGGTATCTCGCTATACTGC
1739 CTCCACACTCCACAATAGATTTCCCACTCGGTCGGGGTCCAGTTGTTTATCGTAAAACACC
1740 ACCTGTGTTTTCGGGCTTTCCCTCCGGACCTAGAATAGGATGACAATAAAAAGTCCTTATCT
1741 TCAGGACACTCGTAGCACCACAAAATTCAGTTATCCAGTCCCCGTCTGCGGCATCAAAA
1742 ACACGAGGCCGCTTCATCATCCACTGCCCGGTATATCCACTCACACGGTGCGGAGCATCC
1743 ATAATGGGATAACCACTTTTTCTCCCTACAGACCTCCGTGGATCCGGGTTCCGAGGTGCCG
1744 GGTAATACTAGCCCGGCACCAAATGAGACACAGAGCTATATTCAGAAGAAGACCCCGCC
1745 CAAGGAGACGACGACGCCACAGAAGGCGCTATGTCAGAAGAAAACATTCATTAGGAGGC
1746 CCACAGCTGGCACATACTACACAAAGAAATACTCCACCATGAACGTCA TTTCCGTTGGAA
1747 CCCCTCAGAATAACAAGCCCTGGCACGCCAACCACTTCATTACCCGCCTAAACGAATGGG
1748 AAAGTGCATTAGCTTTGAATATTATAAGATACTAAAGATGAAAGTTACTCAGCCCTG
1749 TAATTTCTCCGGCTCAGCAAACAAAACCATGTTTCGGGCACACAGCCATAGATCTAGACG
1750 GCGCCTGGACCACAAACACTTGGCTCCAAGACGACCCTTATGCGGAAAGTTCCACTCGTA
1751 AAGTTATGACTTCTAAAAAAAACACAGCCGTTACTTCACCCCCAAACCAATTCTGGCGG
1752 GAACTACCAGCGCTCACCCAGGACAAAGCCTCTTCTTTTTCTCCAGACCCACCCCATGGC
1753 TCAACACATATGACCCACCGTTCAATGGGGAGCACTGCTTTGGAGCATTTATGTCCCGG
1754 AAAAAACTGGAATGACAGACTTCTACGGCACCAAAGAAGTTTGGATTTCGTTACAAGTCCG
1755 TTCTCTAAGTGAAAATAAATATAAATCTGACCCCTCCGGTGGCGACAAGCCGTGTCCCCT
1756 CGCGCGCGCTCCCGCTGCGCTTCGGGTGCGGGCACAGGTAAACGCCCTCGCATGTGGGGA
1757 CCCCATCCCCACATGCTTCGGTGGGGGCGACAAGCCGTGGCTAGGGGGCTGCCACCCA
1758 CCCACCAATAAATAACCCCAACCAACGCAATAATTGTACACAAGTGCAAATAAACTCA
1759 ATAGTTTATTGGATACTGTCTCCATGTCTTTCTTTACCCCCCTCCCCCAACAAAC
1760 AACCTTAGTGAACCTCCTAAACAAGGCCTCCAACCTTTCCACGAATATTCTCCGATGAATA
1761 CCACTCCTCCGGTACAACATTACTAGTAATATATAATACCTTAGCCACAAAATTAACAAA
1762 CCCACCCTTAACAGGAACCC

1763 **Strain: MT075519_Brazil_2018_Wild_Boar**

1764
1765 TTTCTCCAGACCCACCCCATGGCTCAACACATATGACCCACCGTTCAATGGGGAGCACT
1766 GCTTTGGAGCATTTATGTCCCGGAAAAAACTGGAATGACAGACTTCTACGGCACCAAAGA
1767 AGTTTGGATTTCGTTACAAGTCCGTTCTCTAAGTGAAAATAAATATAAATCTGACCCCTCC
1768 GGTGGCGACAAGCCGTGTCCCCTCGCGCGCGCTCCCGCTGCGCTTCGGGTGCGGGCACAG
1769 GTAAACGCCCTCGCATGTGGGGACCCCATCCCCACATGCTTCGGTGGGGGCGACAAGCC
1770 GTGGCTAGGGGGCTGCCACCCACCCACCCAATAAATACCCCCACCCCAACGCAATAATT
1771 GTACACAAGTGCAAATAAACTCAATAGTTTATTGGATACACTGTCTCCATGTCTTTCTTT
1772 ACCCCCCCTCCCCCAACAAACAACCTTAGTGAACCTCCTAAACAAGGCCTCCAACCTT
1773 CCACGAATATTCTCCGATGAATACCACTCCTCCGGTACAACATTACTAGTAATATATAAT
1774 ACCTTAGCCACAAAATTAACAAACCCACCTTAAACAGGAACCTCAGAGGGTACCTGTCC
1775 CCAATTCTCAGCAATTCATCAAATGGAACCCACCCATAAAAATCATCCAGAATAACAGCA
1776 CCCTCCCCATTATAACCATCCCACCAAGGCCCCCGTGGCTTGAAATACAACCTGCAATTCC
1777 CGCGCAGCCGCATCCGCACAAGCTTCCC CGGTTTTCCC GCAACCTGGAGGACCAATAAAA
1778 ACATAAACTTCAGTTTTAAAATCACGCGGTTTACCCAACCCCATCACCCCGCAAAAATCA
1779 CGCAAACCCCGCCCATAGCGTATAAATACTGCAGGCATCTTCTCCGCAACTTCAGTCAGA
1780 TTTCCCGCCGTCTCCGTGAGAATCCGAGCTGCTGCTTGAAGATCCGATCTGGTACCCGAA
1781 GAGGAATCTTCGCCAATCTCGAGGTAATCCCCCTCTTTCTTGCAATACTCGCTGGCCTCT
1782 TTGTGGCTCCCCCTCGCCGGCTCCAGATGGGCCCGACCAAATCCGGGTAAGCGCTTCACC
1783 GAGCTGAGTCGCCTTTTGTCTTGAAATTCACGTACCCTTGCAAGTGTGGGGTACCGCTT
1784 TTTCCAACCTCTTTGCCGATAATAAGGTATCTCGCTATACTGCCTCCACACTCCACAATA
1785 GATTCCCACTCGGTGCGGGTCCAGTTGTTTATCGTAAAACACCACCTGTGTTTTCGGGCTT
1786 TCCCTCCGGACCTAGAATAGGATGACAATAAAAGTCCTTATCTTCAGGACACTCGTAGCA
1787 CCACAAAATTCAGTTATCCAGTCCCCGTCTGCGGCATCAAAACACGAGGCCGCTTCAT
1788 CATCCACTGCCCGGTATATCCACTCACACGGTGC GGAGCATCCATAATGGGATACCACTT
1789 TTTCTCCCTACAGACCTCCGTGGATCCGGGTTCCGAGGTGCCGGGTAATACTAGCCCGGC
1790 ACCAAAATGAGACACAGAGCTATATTCAGAAGAAGACCCCGCCCAAGGAGACGACGACGC
1791 CACAGAAGGCGCTATGTCAGAAGAAAATAATTCATTAGGAGGCCACAGCTGGCACATAC
1792 TACACAAAGAAATACTCCACCATGAACGTCATTTCCGTTGGAACCCCTCAGAATAACAAG
1793 CCCTGGCACGCCAACCCTTATTACCCGCCTAACGAATGGGAAACTGCGATTAGCTTT
1794 GAATATTATAAGATACTAAAGATGAAAGTTACTACTAGCCCTGTAATTTCTCCGGCTCAG
1795 CAAACAAAACCATGTTCCGGGCACACAGCCATAGATCTAGACGGCGCCTGGACCACAAAC
1796 ACTTGGCTCCAAGACGACCCTTATGCGGAAAGTTCCACTCGTAAAGTTATGACTTCTAAA
1797 AAAAAACACAGCCGTTACTTCACCCCAAACCAATTCTGGCGGGAACCTACCAGCGCTCAC
1798 CCAGGACAAAGCCTCTTCTT

ANEXOS

1799
1800
1801

ANEXO A

Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 144/2017

Londrina, 12 de dezembro de 2017.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "**Perfil sanitário de Javalis (*Sus scrofa*) de vida livre no Estado do Paraná.**" protocolo CEUA nº22831.2017.40 sob a responsabilidade de **Alice Fernandes Alfieri**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **28/11/2017**

O objetivo do projeto é avaliar os processos de invasão da espécie não nativa *Sus Scrofa* e seus morfotipos com relação ao hibridismo e aos agentes etiológicos virias, bacterianos, parasitários e protozoários, especialmente aqueles potencialmente zoonóticos, no estado do Paraná, Brasil. Grau de invasividade=4

| | |
|----------------------------|---|
| Vigência do Projeto | Dezembro/2017 a Fevereiro/2021 |
| Espécie/linhagem | Suíno / Asselvajado |
| Nº de animais | 960 |
| Peso/idade | N.D / N.D |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Áreas de manejo de espécie exótica invasora <i>Sus scrofa</i> . |
| Amostras a serem coletadas | Sangue, plasma, soro, fezes, urina, swabs oral, nasal e urogenital e fragmentos de tecido musculares ou órgãos Ectoparasitas. |

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


Prof. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

ANEXO B

Protocolo de técnicas

1802
1803
1804
1805

1806 A) Kit para detecção de anticorpos para *Mycoplasma hyopneumoniae* (IDEXX M. hyo,
1807 Westbrook, ME, USA) ([https://www.idexx.com.br/pt-br/livestock/livestock-tests/swine-](https://www.idexx.com.br/pt-br/livestock/livestock-tests/swine-tests/idexx-m-hyo-ab-test/)
1808 [tests/idexx-m-hyo-ab-test/](https://www.idexx.com.br/pt-br/livestock/livestock-tests/swine-tests/idexx-m-hyo-ab-test/))

1809
1810

1811 1. Descrição da técnica:

1812

- 1813 1.1. Colocar o antígeno nas placas.
- 1814 1.2. Adicionar os controles positivo e negativo conservados com azida sódica nas
1815 cavidades específicas em duplicatas.
- 1816 1.3. Diluir as amostras de soro a serem testadas em proporção 1/40 com o diluente de
1817 amostra tamponado e conservado com azida sódica.
- 1818 1.4. Adicionar as amostras de soro a serem avaliadas nas cavidades específicas.
- 1819 1.5. Incubar por 30 min (\pm 2 min) à 18–26 °C.
- 1820 1.6. As cavidades que possuem anticorpos específicos contra Mhyo vão formar complexos
1821 com os antígenos impregnados.
- 1822 1.7. Lavar cada cavidade, 3-5 vezes, com aproximadamente 350 μ L de solução de
1823 lavagem concentrada com tampão fosfato conservado com gentamicina. Aspirar
1824 completamente a solução de lavagem.
- 1825 1.8. Adicionar 100 μ L conjugado HRPO anti-IgG suína conservado com gentamicina e
1826 Kathon em cada cavidade.
- 1827 1.9. Incubar por 30 min (\pm 2 min) à 18–26 °C.
- 1828 1.10. Lavar cada cavidade, 3-5 vezes, com aproximadamente 350 μ L com solução de
1829 lavagem concentrada com tampão fosfato conservado com gentamicina e aspirar
1830 completamente a solução de lavagem.
- 1831 1.11. Adicionar 100 μ L de Substrato TMB em cada cavidade.
- 1832 1.12. Adicionar por 15 min (\pm 1 min) à 18–26 °C.
- 1833 1.13. Adicionar 100 μ L de Solução de Interrupção em cada cavidade para interromper a
1834 reação.
- 1835 1.14. Ler e registrar valores de absorbância à 650 nm, A (650).

1836

1837 2. Reagentes empregados:

1838

1839 2.1. Antígeno Mhyo

1840 2.2. Controle positivo conservado com azida sódica – soro diluído anti-Mhyo de suínos.

1841 2.3. Controle negativo conservado com azida sódica – soro diluído não reativo para Mhyo de
1842 suínos.

1843 2.4. Conjugado HRPO anti-IgG suína conservado com gentamicina e Kathon

1844 2.5. Diluente de amostra tamponado e conservado com azida sódica

1845 2.6. Substrato TMB

1846 2.7. Solução de interrupção

1847 2.8. Solução de lavagem concentrada (10x) com Tampão fosfato conservada com gentamicina

1848 3. Cálculos:

1849

1850 3.1. Média de controle negativo (CN_x)

1851

1852

$$\frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2} = CN_x$$

1853

1854

1855 3.2. MÉDIA DE CONTROLE POSITIVO (CP_x)

1856

$$\frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2} = CP_x$$

1857

1858

1859 3.3. Coeficiente A/P

1860

$$\frac{Amostra A(650) - CN_x}{CP_x - CN_x} = A/P$$

1861

1862

1863 3.4. Título – Relaciona A/P em diluição 1/40 com título final

1864

1865

$$\log_{10} \text{Título} = 1,09 \times (\log_{10} A/P) + 3,36$$

1867

1868

1869 4. Interpretação de Resultados:

1870

1871

1872 4.1. $A/P < 0,30$ são consideradas negativas para anticorpos para Mhyo.

1873 4.2. $0,3 \geq A/P \geq 0,4$ são consideradas como suspeitas para anticorpos para Mhyo.

1874 4.3. $A/P > 0,4$ são consideradas positivas para anticorpos para Mhyo.

- 1875 Extração de DNA com kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA).
- 1876 1. Em capela de fluxo laminar, previamente higienizada com etanol 70% e ligada com
1877 incidência de luz UV por 10 min, macerar 25 mg de tecido a ser analisado;
- 1878 2. Colocar o macerado em frasco de 1,5 mL;
- 1879 3. Este procedimento se aplica ao uso do kit DNeasy (Qiagen código 69506);
- 1880 4. Ressuspender o pellet em 180 mL tampão ATL;
- 1881 5. Adicionar 20 µL de proteinase K e agitar em vórtex;
- 1882 6. Incubar por 1 a 3 h, em temperatura de 56 °C, agitando ocasionalmente. A incubação
1883 deve acontecer até que o tecido esteja completamente lisado. Pode ser por uma noite,
1884 sem prejuízo para a qualidade do DNA;
- 1885 7. Agitar em vórtex por 15 s;
- 1886 8. Adicionar 200 µL de buffer AL e agitar em vórtex;
- 1887 9. Incubar por 10 min em temperatura de 70°C;
- 1888 10. Adicionar 200 µL de etanol (96 a 100%) e agitar em vórtex;
- 1889 11. Transferir o conteúdo do microtubo para coluna acoplada ao tubo coletor;
- 1890 12. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 min, em temperatura ambiente;
- 1891 13. Desprezar o líquido do tubo coletor. Adicionar 500 µL de tampão AW1 à coluna
1892 adaptada ao tubo coletor;
- 1893 14. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 min;
- 1894 15. Desprezar o líquido do tubo coletor;
- 1895 16. Adicionar 500 µL de tampão AW2 à coluna adaptada ao tubo coletor;
- 1896 17. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 min;
- 1897 18. Desprezar o líquido do tubo coletor;
- 1898 19. Passar a coluna para tubo de 1,5 mL. O DNA será armazenado neste tubo;
- 1899 20. Adicionar 75 µL de tampão AE no centro da coluna;
- 1900 21. Incubar por 1 min em TA;
- 1901 22. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min;
- 1902 23. Desprezar a coluna;
- 1903 24. Armazenar a -20 °C.

1904 2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

1905 Para a amplificação de um segmento do genoma é utilizado o par de primers abaixo descrito:

1906 - Diag PCV3 F: 5' – CCACAGAAGGCGCTATGTC – 3';

1907 - Diag PCV3 R: 5' – CCGCATAAGGGTCGTCTTG – 3.

1908 O fragmento amplificado tem 330 pares de bases.

1909 Reagentes utilizados na reação da PCR:

1910 1. DNA da amostra - 2 μ L

1911 2. Tampão da enzima *Taq* DNA polimerase s/Mg (10X) - 2,5 μ L

1912 3. DNTPs 10 mM - 1 μ L

1913 4. MgCl₂ 50 mM - 1 μ L

1914 5. *Primer F* PCV3 F (10 pmol) - 0,8 μ L

1915 6. *Primer R* PCV3 R (10 pmol) - 0,8 μ L

1916 7. *Taq* DNA polimerase (5 U/ml) - 0,2 μ L

1917 8. Água ultra pura - 16,7 μ L

1918 Programa utilizado no termociclador:

1919 1. Etapa 1: 95 °C – 1 min

1920 2. Etapa 2: 95 °C – 30 seg; 60 °C – 30 seg; 72 °C – 1 min

1921 3. Etapa 3: go to step 2–38 X

1922 4. Etapa 4: 72 °C – 10 min

- 1923 B) Imuno-histoquímica utilizando o kit LSAB® + System – HRP - DakoCytomation®
1924 (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA)
- 1925
- 1926 1. Descrição da técnica:
- 1927 1.1. Fixar os fragmentos de pulmão em formol 10% e os embeber em parafina;
- 1928 1.2. Cortar o pulmão em fragmentos de 3 µm de espessura e fixar dos mesmos em lâminas
1929 tratadas com poli-L-lisina;
- 1930 1.3. Desparafinar e desidratar os fragmentos;
- 1931 1.4. Submeter os fragmentos à recuperação de antígeno por irradiação em microondas por 5
1932 min a 700W, por duas vezes, e por digestão enzimática com pepsina 0,04% (pH 8,0) a
1933 37°C por 10 min em câmara úmida.
- 1934 1.5. Submeter ao bloqueio da peroxidase endógena, sendo submersas em peróxido de
1935 hidrogênio (H₂O₂ a 3,0% por 5 min);
- 1936 1.6. Incubar à 37 °C por 2h com anticorpo recombinante policlonal monoespecífico contra
1937 proteína lactato-desidrogenase - p36 com diluição 1:500 em solução contendo tampão
1938 Fosfato- Salino (PBS), BSA (Bovine Serum Albumin) e azida sódica.
- 1939 1.7. Adicionar estravidina-biotina-peroxidase e incubar por 30 min a 37 °C e revelar com 3-
1940 amino-9-etilcarbazol (AEC) por 5 min a 37 °C;
- 1941 1.8. Fazer coloração de contraste com hematoxilina de Mayer por 2 min, e enxaguar as
1942 lâminas com PBS (pH 7,4) nas lavagens entre cada passo.
- 1943 1.9. Ler as lâminas, sendo os resultados expressos de acordo com a presença ou ausência de
1944 antígeno marcado
- 1945
- 1946 2. Reagentes utilizados:
- 1947
- 1948 2.1. Bloqueio de peroxidase – Peróxido de hidrogênio a 3% em água
- 1949 2.2. Anticorpo de ligação – Imunoglobulinas isoladas por afinidade marcadas com biotina em
1950 solução salina com tampão fosfato (PBS), contendo proteína estabilizadora e 0,015 mol/L
1951 de azida de sódio.
- 1952 2.3. Estreptavidina –HRP (Estreptavidina conjugada com Horseradish Peroxidase) em PBS
1953 contendo proteína estabilizadora e agentes antimicrobianos.

- 1954 2.4. Anticorpo recombinante policlonal monoespecífico contra proteína lactato-desidrogenase
1955 - p36 com diluição 1:500 em solução contendo tampão Fosfato-Salina (PBS), BSA
1956 (Bovine Serum Albumin) e azida sódica.
- 1957 2.5. Substrato-cromogênico AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) em N, N-dimetilformamida
1958 (DMF) e tampão de acetato, pH 5,0, contendo peróxido de hidrogénio, estabilizadores,
1959 intensificadores e agente antimicrobiano.
- 1960 2.6. Hematoxilina de Mayer.
- 1961 2.7. Controle positivo – fragmento de pulmão suíno com lesão contendo Mhyo.
- 1962 2.8. Controle negativo – fragmento de pulmão normal de suínos livres de patógenos
1963 específicos (SPF).

1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982

ANEXO C

Softwares

1. Blast The Basic Local Alignment Search Tool
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. BioEdit *software* versão 7.2.6.1.
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
3. IBM corp. IBM SPSS Statistics for Windows 2012.
(<https://www.ibm.com/br-pt/analytics/spss-statistics-software>)
4. MEGA versão 6.0
(<https://www.megasoftware.net>)
5. Qualidade, análise e montagem das sequências – Phred, Lucy e CAP3
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>); (<http://lucy.sourceforge.net>)