

**UNIVERSIDADE PAULISTA- UNIP**

**DIEGO FERREIRA DA SILVA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2a e  
PCV2b) EM POPULAÇÕES DE QUEIXADAS: IMPLICAÇÕES PARA UMA  
SÓ SAÚDE**

**SÃO PAULO**

**2025**

**DIEGO FERREIRA DA SILVA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2a e PCV2b)  
EM POPULAÇÕES DE QUEIXADAS: IMPLICAÇÕES PARA UMA SÓ SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Profa. Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.

**SÃO PAULO**

**2025**

Biblioteca Central da Universidade Paulista.

Guia de normalização para apresentação de trabalhos acadêmicos da Universidade Paulista: Vancouver / Biblioteca Central da Universidade Paulista UNIP. – 2025. 54 p. : il. color. ESTE FICHA É FEITA NA Biblioteca. Tem que ligar la e ver como faz.

1. Normalização. 2. Trabalhos acadêmicos. 3. Vancouver. I. Biblioteca Universidade Paulista.

**DIEGO FERREIRA DA SILVA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2a e PCV2b)  
EM POPULAÇÕES DE QUEIXADAS: IMPLICAÇÕES PARA UMA SÓ SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Profa. Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Paulista – UNIP

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 1761671 – Código de Financiamento 001), cujo financiamento foi fundamental para a concretização desta pesquisa e para o desenvolvimento acadêmico durante o período de doutorado.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força e sabedoria, expresso minha mais profunda gratidão. Ele conhece cada um dos meus caminhos e, com seu tempo perfeito, sustentou-me nos momentos de incerteza, tornando possível a realização deste sonho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, dedicação e pelos valores e princípios que me transmitiram. À minha mãe, pela ternura e sabedoria, e ao meu pai, pela força e coragem são e sempre serão exemplos de vida e inspiração diária.

À minha orientadora, professora Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, minha admiração e sincero agradecimento. Sua dedicação à ciência, seu rigor acadêmico, sua sensibilidade como educadora e sua constante disposição para orientar com paciência e generosidade foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse. Seu exemplo como pesquisadora e ser humano será uma inspiração permanente em minha trajetória profissional.

Aos amigos que construí ao longo da pós-graduação, especialmente à Débora, que gentilmente me auxiliou nas técnicas de PCR, e à Sheila, cuja ajuda nos laboratórios e presença constante foram indispensáveis. Mesmo nos momentos em que não pude estar tão presente, encontrei nelas apoio, parceria e amizade, elementos valiosos que tornaram essa jornada mais leve e significativa.

Finalizo com uma frase que resume este percurso: “Nenhum caminho é longo demais quando se tem com quem compartilhá-lo.” A todos que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista, deixo meu mais sincero e profundo agradecimento.

*"O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo."*  
Winston Churchill

## RESUMO

**SILVA, DF. Análise molecular de Circovírus *Porcino* tipo 2 (pcv2a e pcv2b) em populações de queixadas: implicações para uma só saúde. Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2025. 54 p. Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.**

O Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) é um agente viral de ampla distribuição global, reconhecido por seu impacto na suinocultura e pela capacidade de infectar outras espécies hospedeiras. Sua emergência em ambientes naturais suscita preocupações no campo da Uma Só Saúde (One Health), sobretudo em ecossistemas fragmentados como a Mata Atlântica brasileira, onde interações entre fauna silvestre, animais domésticos e humanos são favorecidos. A detecção do PCV2 em espécies ameaçadas de extinção representa não apenas um alerta sanitário, mas também um desafio à conservação da biodiversidade. **Objetivo:** Avaliar a presença dos genótipos PCV2a e PCV2b em amostras biológicas de *Tayassu pecari* (queixadas) em três unidades de conservação do estado de São Paulo, integrando vigilância molecular com aspectos ecológicos e geográficos sob a ótica da Uma Só Saúde. **Método:** Foram analisadas 157 amostras de 116 indivíduos, incluindo soro, tecidos e swabs retais, provenientes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia (PESM-SV) e da Estação Ecológica dos Caetetus (EEC). A detecção viral foi realizada por qPCR com quantificação absoluta da carga viral. A análise considerou variações ambientais e a localização dos parques. **Resultados:** Das 19 amostras positivas (8 PCV2a; 12 PCV2b), uma amostra (Q8) apresentou positividade simultânea para ambos os genótipos, embora corresponda ao mesmo animal e coleta, concentradas nas regiões litorâneas do PEIC e PESM-SV. Em contrapartida, não houve detecção na EEC, uma unidade de conservação mais isolada, localizada no interior paulista. Essa diferença reforça o papel da pressão antrópica, da conectividade ecológica e da proximidade com atividades humanas na disseminação viral. **Conclusão:** Os achados revelam um possível foco de circulação viral em áreas costeiras e sugerem que fatores ambientais modulam a distribuição do PCV2 em populações silvestres. A integração entre vigilância genômica, gestão ambiental e estratégias de Saúde Única é essencial para antecipar riscos e proteger espécies vulneráveis. Este estudo inaugura uma nova fronteira na interface entre

virologia, ecologia e conservação, fornecendo subsídios críticos para políticas públicas em saúde e meio ambiente.

## ABSTRACT

**SILVA, DF. Molecular analysis of Porcine Circovirus type 2 (pcv2a and pcv2b) in white-lipped peccary populations: implications for one health. PhD Thesis (Environmental and Experimental Pathology) - Paulista University, São Paulo, 2025. 54 p. Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.**

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is a globally distributed viral agent, widely recognized for its impact on swine production and its ability to infect other host species. Its emergence in natural environments raises serious concerns within the One Health framework, particularly in fragmented ecosystems such as Brazil's Atlantic Forest, where interactions between wildlife, domestic animals, and humans are intensified. The detection of PCV2 in endangered species represents not only a sanitary alert but also a critical challenge to biodiversity conservation. **Objective:** To assess the presence of PCV2a and PCV2b genotypes in biological samples from *Tayassu pecari* (white-lipped peccaries) in three conservation units in the state of São Paulo, integrating molecular surveillance with ecological and geographic variables under a One Health approach. **Method:** A total of 157 samples from 116 individuals were analyzed, including serum, tissues, and rectal swabs. Samples were collected from the Ilha do Cardoso State Park (PEIC), Serra do Mar State Park – Santa Virgínia Nucleus (PESM-SV), and the Caetetus Ecological Station (EEC). Viral detection was performed using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with absolute quantification of viral load. The analysis considered environmental variation and geographical differences between the parks. **Results:** Of the 19 positive samples (8 PCV2a; 12 PCV2b), one sample (Q8) showed simultaneous positivity for both genotypes, although it originated from the same animal and collection. These positives were concentrated in the coastal regions of PEIC and PESM-SV. In contrast, no detection occurred in EEC, a more isolated conservation unit located in the interior of São Paulo state. This difference highlights the role of anthropogenic pressure, ecological connectivity, and proximity to human activities in viral dissemination. **Conclusion:** The findings indicate a potential hotspot for viral circulation in coastal areas and suggest that environmental factors modulate PCV2 distribution in wild populations. The integration of genomic

surveillance, environmental management, and One Health strategies is essential to anticipate risks and protect vulnerable species. This study pioneers a novel interface between virology, ecology, and conservation, offering critical insights for public health and environmental policy development.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mapa do estado de São Paulo com demarcação da localização dos pontos de origem das amostras. Vermelho - Estação Ecológica de Caetetus; Azul - Parque Estadual Serra do Mar, núcleo de Santa Virgínia; Amarelo - do Parque Estadual da Ilha do Cardoso.....24
- Figura 2 – Caracterização das amostras de *Tayassu pecari* no estado de São Paulo: (A) distribuição percentual dos tipos de material biológico coletado; (B) número de amostras por unidade de conservação e ano (2013–2018).....32
- Figura 3 – Curva padrão da PCR em tempo real para detecção da ORF2 de PCV2a (A) e PCV2b (B), com diluições decimais de DNA plasmidial ( $10^6$  a  $10^1$  cópias/ $\mu$ L), indicando o limite de detecção da reação.....34
- Figura 4 – Retas de regressão das curvas-padrão de PCV2a (pontos vermelhos) e PCV2b (pontos cinza), com diluições decimais de DNA plasmidial ( $10^6$  a  $10^1$  cópias/ $\mu$ L).....36
- Figura 5 – Localização dos animais positivos para PCV2 no estado de São Paulo. O mapa destaca as três unidades de conservação amostradas e detalha, por área, os tipos de amostras positivas, os indivíduos identificados e o número de casos. Não houve detecção na EEC.....37
- Figura 6. Distribuição dos valores médios de *Ct* (Cycle Threshold) por genótipo viral (PCV2a e PCV2b) detectados em *Tayassu pecari*.....37

## LISTA DE SIGLAS

**APA** – American Psychological Association

**CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**EEC** – Estação Ecológica dos Caetetus

**FAO** – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

**ICMBio** – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

**INPE** – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

**IPE** – Instituto de Pesquisas Ecológicas

**IPMA** – Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica

**IUCN** – International Union for Conservation of Nature (União Internacional para a Conservação da Natureza)

**MMA** – Ministério do Meio Ambiente

**MT** – Massa Total

**NTC** – Controle Negativo de Transcrição

**ORF** – Open Reading Frame (Quadro de Leitura Aberto)

**PCV2** – Porcine Circovirus type 2

**PCV2a** – Genótipo A do Circovírus Suíno tipo 2

**PCV2b** – Genótipo B do Circovírus Suíno tipo 2

**PEIC** – Parque Estadual da Ilha do Cardoso

**PESM-SV** – Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia

**PMWS** – Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome

**qPCR** – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa

**RCP** – Reação em Cadeia da Polimerase

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**RT-qPCR** – Transcrição Reversa seguida de PCR em Tempo Real

**SISBIO** – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**UF** – Unidade de Filtragem

**USP** – Universidade de São Paulo

**WHO** – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras de soro, fezes e tecidos de <i>Tayassu pecari</i> coletadas entre 2013 e 2019 em três unidades da Mata Atlântica do estado de São Paulo (PEIC, PESM-SV e EEC) .....	25
Quadro 1. Diluição seriada da curva padrão com seus respectivos números de cópias de DNA calculados para PCV2a e PCV2b.....	29
Quadro 2. Relação do par de <i>primers</i> e sonda que serão empregados nas qPCR de acordo com a posição do nucleotídeo (nt)35.....	29
Tabela 2 – Valores de <i>Ct</i> e desvio-padrão intra-ensaio para cada diluição da curva padrão dos genótipos PCV2a e PCV2b.....	34
Tabela 3 – Parâmetros da curva-padrão da qPCR multiplex para PCV2.....	35
Tabela 4- Resultados de PCR em Tempo Real para Detecção de PCV2a e PCV2b em Amostras de Animais Silvestres de Três Unidades de Conservação no Estado de São Paulo. ....	38
Tabela 5- Associação entre tipo de amostra ou local de coleta e chance de PCR-positividade para PCV2 em <i>Tayassu pecari</i> (modelo GEE binomial, cluster = indivíduo). ....	40

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Porcine Circovírus tipo 2 (PCV2) .....	17
1.2 Porcine Circovírus tipo 2 (PCV2) em animais selvagens no Brasil .....	19
1.3 Porcine Circovírus tipo 2 (PCV2) em animais selvagens e as implicações para a uma só saúde .....	20
2. OBJETIVOS .....	23
3.1. Amostras.....	24
3.3 Processamento das amostras.....	27
3.4 Validação da Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) multiplex para diferenciação de PCV2a e PCV2b .....	28
3.5 Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) multiplex para diferenciação de PCV2a e PCV2b .....	30
4.RESULTADOS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 Validação da Reação de qPCR .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2 Resultados dos Testes Endógenos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. DISCUSSÃO .....	41
6 CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Porcine Circovírus tipo 2 (PCV2)

Os circovírus suínos (PCV) são os menores vírus de DNA de fita simples (ssDNA), pertencentes à família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*. Esses vírus possuem um genoma circular com comprimento de 1,7 a 2,0 kb e vírions icosaédricos<sup>1</sup>. Até o momento, foram identificadas quatro espécies do gênero *Circovirus* que causam infecções em suínos: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4<sup>2</sup>. O PCV1 foi detectado pela primeira vez em 1974<sup>3</sup> como contaminante de culturas celulares PK-15, sendo considerado não patogênico para suínos<sup>4</sup>. Já o PCV2, isolado em 1998, é reconhecido como o agente etiológico das Doenças do Circovírus Suíno (PCVD), originalmente descritas como Síndrome de Emaciação Multissistêmica Pós-Desmame (PMWS)<sup>5</sup>. O PCVD agrupa várias condições patológicas que afetam múltiplos sistemas orgânicos, causando um significativo impacto econômico na suinocultura global<sup>5</sup>. Em 2017, o PCV3 foi identificado nos EUA<sup>6</sup> e posteriormente na Ásia e Europa<sup>7,8</sup>, enquanto o PCV4 foi detectado mais recentemente, em 2019, na China e Coreia do Sul<sup>9,10</sup>. Embora PCV3 e PCV4 tenham sido encontrados em associação com diversas condições clínicas em suínos, frequentemente em coinfeções com outros patógenos virais, sua patogenicidade ainda é tema de debate<sup>11,12</sup>.

Atualmente, o PCV2 é considerado um vírus ubíquo, representando uma ameaça significativa à indústria suína. A expansão do comércio internacional de animais vivos e o desenvolvimento da criação intensiva de suínos contribuíram para as proporções epidêmicas do PCVD em escala global<sup>1</sup>. Javalis também são suscetíveis à infecção por PCV2, apresentando títulos virais mais baixos do que os suínos domésticos e raramente manifestando a condição clínica<sup>5</sup>. A alta prevalência de PCV2 em javalis, relatada em diversos países europeus e em países latino-americanos, confirma o papel desses animais como reservatórios naturais do vírus<sup>13-15</sup>. O PCV2 também foi isolado de outras espécies animais, incluindo ruminantes, roedores, caninos, insetos e até humanos, sugerindo múltiplos reservatórios e a possível transmissão interespecie. Em humanos, embora não haja comprovação de infecção ativa ou associação direta com doenças, estudos sorológicos e moleculares detectaram a presença de anticorpos e antígenos de

PCV1 e PCV2 em amostras de soro, trato digestivo e respiratório, indicando possível exposição. Além disso, PCVs já foram identificados como contaminantes em vacinas humanas, como as contra rotavírus, o que reforça a necessidade de vigilância quanto ao potencial zoonótico e à segurança de produtos biológicos. No entanto, a taxa de detecção em humanos é baixa e a relevância clínica dessas descobertas permanece incerta, exigindo mais investigações<sup>16</sup>.

O genoma do PCV2 inclui, hipoteticamente, pelo menos 11 quadros de leitura aberta (ORFs), dos quais seis foram descritos como codificadores de diferentes proteínas estruturais e não estruturais<sup>17</sup>. O ORF1 codifica duas proteínas (Rep e Rep') associadas à replicação viral, enquanto o ORF2, conhecido como gene cap, codifica a proteína estrutural do capsídeo viral, sendo crucial para a ligação vírus/hospedeiro e utilizado na genotipagem do PCV2<sup>18,19</sup>. As ORFs remanescentes (ORF3 a ORF6) codificam proteínas não estruturais envolvidas na apoptose celular e interação com outras proteínas, facilitando a replicação e sobrevivência viral<sup>18-20</sup>.

Semelhante aos vírus de RNA, o PCV2 apresenta a maior variabilidade de substituição de nucleotídeos entre os vírus de DNA<sup>21</sup>. Critérios de classificação atualizados propuseram oito genótipos distintos de PCV2 (PCV2a-h), com um novo genótipo, PCV-2i, sendo proposto posteriormente<sup>21,22</sup>. A evolução do PCV2, influenciada por sua alta taxa de mutação e práticas da indústria suína, resultou no surgimento de novas variantes genéticas, detectadas em ondas periódicas e frequentemente substituídas por genótipos emergentes<sup>22,23</sup>.

Nas últimas décadas, o genótipo PCV2 tem apresentado um aumento significativo na prevalência tanto em suínos domésticos quanto em animais selvagens, abrangendo regiões na Europa, Ásia e América<sup>24</sup>. Estudos recentes destacam a predominância dos genótipos PCV2a e PCV2b em animais selvagens, como os javalis<sup>25,15</sup>. A necessidade de investigações adicionais sobre a epidemiologia molecular do PCV2 é imperativa para compreender a dinâmica das variantes genéticas em suínos selvagens, como catetos (*Pecari tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*), no Brasil. Este estudo tem como objetivo principal avaliar a ocorrência de mudanças genotípicas do PCV2, com foco nos genótipos PCV2a e PCV2b, na população de catetos e queixadas na região de São Paulo.

## **1.2 *Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) em animais selvagens no Brasil***

A presença de *Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2)* em javalis selvagens tem sido documentada em várias regiões do mundo, incluindo a Europa, Ásia e América do Norte, revelando a ampla distribuição geográfica e a adaptabilidade do vírus. No Brasil, estudos recentes também identificaram a presença de PCV2 em populações de javalis, particularmente no sul do país. A pesquisa de Castro et al. (2012)<sup>15</sup> revelou a detecção de PCV2 em javalis em uma fazenda de semiconfinamento, associada a uma alta mortalidade de suínos jovens. Esse estudo demonstrou que o genótipo PCV2a estava presente, o que destaca a necessidade de vigilância contínua e investigação molecular para compreender a epidemiologia do PCV2 em populações de animais selvagens no Brasil.

A importância dos javalis como reservatórios de patógenos suínos, incluindo PCV2 e PCV3, é bem reconhecida devido ao seu potencial de transmissão para suínos domésticos. A pesquisa de Dal Santo et al. (2022)<sup>26</sup> reforça essa preocupação ao detectar altas taxas de infecção por PCV2 (57,7%) e PCV3 (15,4%) em javalis no Rio Grande do Sul. A co-infecção com ambos o vírus foi observado, indicando a complexidade da dinâmica viral e a necessidade de monitoramento epidemiológico rigoroso. A extensa distribuição dos javalis no Brasil e seu papel como hospedeiros de patógenos suínos sublinham a urgência de estudos adicionais para mapear a prevalência e os impactos dessas infecções em diferentes regiões do país.

A relevância da investigação sobre PCV2 em animais selvagens, como queixadas, no Brasil é ainda mais crítica devido ao impacto econômico significativo do PCV2 na indústria suína. A detecção e caracterização de variantes genéticas de PCV2 em suínos selvagens podem fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doenças. Além disso, entender a epidemiologia molecular do PCV2 em animais selvagens é essencial para avaliar os riscos zoonótico e desenvolver políticas de saúde pública eficazes.

Assim, este estudo visa preencher lacunas críticas no conhecimento sobre a presença e a dinâmica do PCV2 em catetos e queixadas, contribuindo para a conservação da biodiversidade e a proteção da saúde pública e animal.

### **1.3 *Porcine Circovirus* tipo 2 (PCV2) em animais selvagens e as implicações para a uma só saúde**

Diante da presença do PCV2 em animais silvestres, torna-se imprescindível adotar uma perspectiva ampliada que considere não apenas a saúde animal, mas também os possíveis impactos na saúde humana e ambiental, conforme proposto pelo conceito de Uma Só Saúde. Uma Só Saúde é uma abordagem integrada e colaborativa que reconhece a interconexão entre a saúde humana, a saúde animal e a saúde ambiental. Esse conceito propõe que a prevenção e o controle de doenças, especialmente as zoonoses, devem ser conduzidos por meio da cooperação interdisciplinar entre profissionais da medicina, medicina veterinária, ciências ambientais, saúde pública e outras áreas correlatas. Ao considerar que seres humanos, animais e ecossistemas compartilham o mesmo ambiente, a perspectiva de Uma Só Saúde busca soluções sustentáveis e coordenadas para enfrentar os desafios sanitários contemporâneos, promovendo o bem-estar coletivo e a segurança global em saúde<sup>27</sup>.

A presença de *Porcine Circovirus* tipo 2 (PCV2) em animais selvagens, como queixadas (*Tayassu pecari*), possui significativas implicações para Uma Só Saúde, um conceito que integra a saúde humana, animal e ambiental.<sup>28</sup> Esses animais selvagens, que habitam áreas de grande biodiversidade no Brasil, podem atuar como reservatórios naturais do vírus, facilitando a disseminação do PCV2 não apenas entre populações selvagens, mas também para suínos domésticos e, potencialmente, para outros animais. A proximidade ecológica e interações entre espécies selvagens e criações de suínos aumentam o risco de transmissão viral, destacando a importância de monitorar a prevalência do PCV2 em habitats naturais para entender melhor as dinâmicas de infecção e desenvolver estratégias de mitigação adequadas.

O impacto ambiental e na saúde pública decorrente da infecção por PCV2 em queixadas é igualmente preocupante. A circulação do vírus em populações selvagens pode levar à introdução e propagação de novas variantes genéticas, aumentando a complexidade da gestão de saúde animal. Além disso, a infecção por PCV2 pode comprometer a saúde desses animais selvagens, afetando a biodiversidade e os ecossistemas onde vivem. A presença do PCV2 em diversas espécies animais, incluindo ruminantes, roedores, caninos, insetos e, de forma pontual, em humanos, como

evidenciado por estudos sorológicos e moleculares, levanta preocupações quanto ao seu potencial zoonótico e à possibilidade de transmissão interespecies.<sup>16</sup> Embora a infecção ativa por PCV2 em humanos ainda não esteja plenamente estabelecida, evidências sorológicas e moleculares demonstram a presença de anticorpos contra PCV1 e antígenos de PCV2 em amostras humanas, incluindo soro, trato digestivo e vias respiratórias<sup>29,30</sup>.

Além disso, a detecção de PCVs como contaminantes em vacinas humanas e produtos biológicos derivados de suínos reforça o potencial zoonótico desses vírus e sua ampla disseminação ambiental. Mais recentemente, relatos da presença de circovírus humanos geneticamente próximos ao PCV3 em pacientes imunossuprimidos, como receptores de transplante, reforçam a preocupação com os efeitos desses vírus em populações vulneráveis<sup>31</sup>. A via de exposição humana pode incluir o consumo ou manuseio de carne contaminada, como a de queixadas infectados, especialmente em regiões onde a caça e o abate de animais silvestres são práticas comuns<sup>29,30</sup>.

Dessa forma, investigar a infecção por PCVs em humanos não apenas esclarece os riscos de transmissão cruzada, mas também fundamenta a necessidade de uma abordagem de Uma Só Saúde. Esta abordagem integra os domínios humano, animal e ambiental para prevenção de surtos, vigilância de doenças emergentes e formulação de políticas públicas eficazes, especialmente frente à crescente identificação de novos circovírus em diversas espécies.

. Assim, investigar a circulação do PCV2 em espécies silvestres torna-se essencial não apenas para o controle sanitário animal, mas também para a formulação de políticas públicas integradas que visem à proteção simultânea da saúde humana, animal e ambiental refletindo de forma clara e objetiva os princípios do conceito de Uma Só Saúde.

- **Justificativa**

A identificação de PCV2 em animais selvagens no Brasil, especificamente em queixadas na região de São Paulo, possui uma importância crucial tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública. A presença de PCV2 em populações selvagens

representa uma potencial fonte de infecção para suínos domésticos, o que pode impactar negativamente a indústria suína, uma das mais importantes do Brasil.

Estudos anteriores, como os de Castro et al. (2012)<sup>1528</sup>e outros autores<sup>2632</sup> demonstraram a circulação de PCV2 em javalis no Brasil, o que evidencia a capacidade desses animais de atuar como reservatórios do vírus. Compreender a epidemiologia e a dinâmica de infecção de PCV2 em animais selvagens é essencial para desenvolver estratégias eficazes de controle e prevenção de doenças, que podem mitigar surtos e evitar perdas econômicas significativas.

Além das implicações diretas para a saúde animal, a investigação de PCV2 em espécies selvagens também é vital para a saúde pública sob a perspectiva da Uma Só Saúde (One Health)<sup>33</sup>. Este conceito integra a saúde humana, animal e ambiental, reconhecendo que a saúde de cada um desses componentes está interconectada. A interação entre seres humanos e animais silvestres pode ocorrer mesmo na ausência de convívio direto, por meio do compartilhamento de ambientes naturais, da exploração de recursos ecossistêmicos ou da exposição a resíduos e secreções animais. Essas formas de contato indireto ampliam o risco de transmissão de agentes infecciosos com potencial zoonótico, sobretudo em regiões onde a presença humana avança sobre habitats naturais. Tal cenário reforça a importância de estratégias preventivas fundamentadas na abordagem de Uma Só Saúde, que integra os domínios da saúde humana, animal e ambiental de forma coordenada e sustentável. Embora o PCV2 seja predominantemente uma preocupação veterinária, a sua capacidade de infecção em múltiplas espécies, incluindo potenciais infecções em humanos, não pode ser descartada. Portanto, monitorar e entender a prevalência e a disseminação de PCV2 em populações selvagens é fundamental para antecipar e prevenir possíveis riscos zoonóticos.

Dessa forma, a pesquisa sobre a presença de PCV2 em queixadas no Brasil preenche lacunas importantes no conhecimento atual, fornecendo dados epidemiológicos essenciais que podem informar políticas públicas e estratégias de manejo de doenças. Este trabalho não apenas contribui para a proteção da saúde animal e a estabilidade da indústria suína, mas também fortalece as medidas preventivas de saúde pública, alinhando-se com os princípios da Uma Só Saúde ao promover um ambiente mais seguro e saudável para humanos e animais.

## **2. OBJETIVOS**

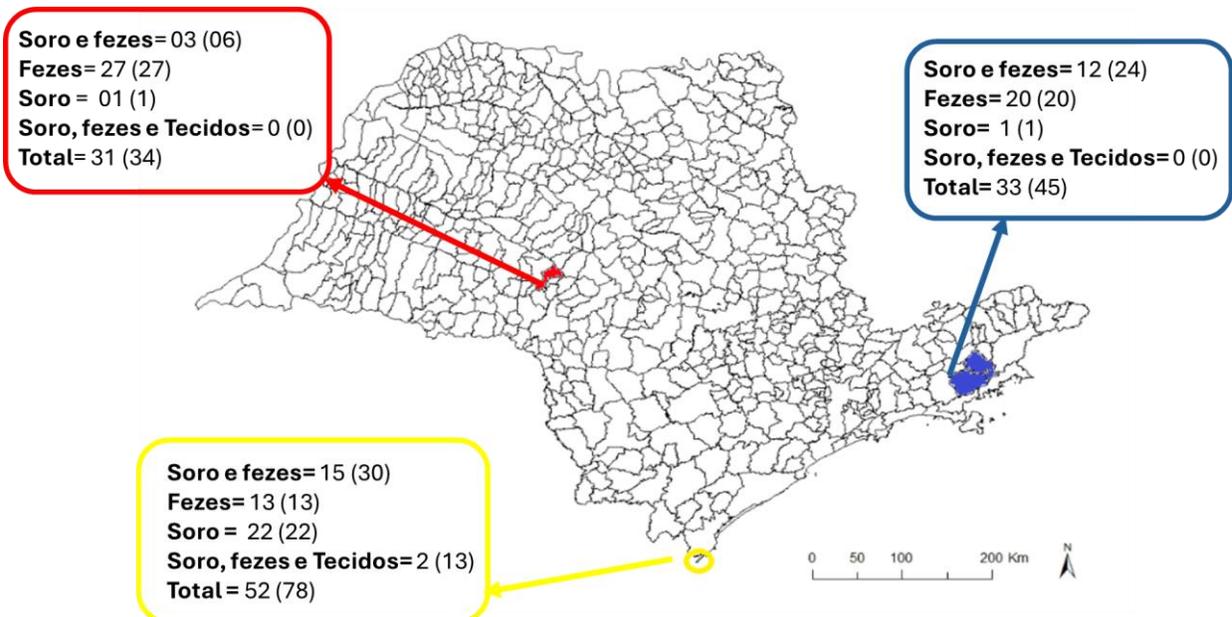
Investigar a presença do *Porcine Circovirus* tipo 2 (PCV2) especificamente PCV2a e PCV2b em populações queixadas (*Tayassu pecari*) na região de São Paulo, Brasil- Mata Atlântica, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

As amostras foram doadas para o nosso grupo de pesquisa (Anexo 1) e devidamente aprovadas pelos comitês responsáveis, conforme o CEUA no 4837100519 (Anexo 2) e pelo SISBIO no 51307-5 (Anexo 3). Essas amostras foram coletadas de espécimes de *Tayassu pecari* de vida livre em três regiões de Mata Atlântica no estado de São Paulo (Figura 1): Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC, Cananéia) (Anexo 4), Parque Estadual da Serra do Mar Núcleo Santa Virgínia (PESM-SV, São Luiz do Paraitinga) (Anexo 5) e Estação Ecológica de Caetetus (EEC, Gália) (Anexo 6). As amostras doadas pelo grupo de pesquisa.

**Figura 1** - Distribuição geográfica do número de animais por local de coleta no estado de São Paulo, com indicação entre parênteses do número total de amostras obtidas (soro/fezes, fezes, soro e tecidos). (Amarelo) PEIC, Cananéia; (Azul) PESM-SV, São Luiz do Paraitinga; (Vermelho) EEC, Gália.



A captura dos animais foi realizada por meio de armadilhas específicas, instaladas e monitoradas em pontos estratégicos dentro das áreas de preservação, como parte de um projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP), voltado à avaliação sanitária e genética das populações de queixadas. O manejo seguiu rigorosos protocolos de bem-estar animal e biossegurança. Parte dos animais capturados foi amostrada em vida, com coleta de sangue para obtenção de soro e swab retal.

As amostras de tecidos foram obtidas exclusivamente de animais que morreram durante o processo de captura, devido a causas naturais ou hipotermia, sem intervenção humana direta. Dentre os espécimes que vieram a óbito, dois foram destacados: um indivíduo jovem, que apresentou sinais compatíveis com morte por hipotermia, e outro de idade avançada, encontrado em condições clínicas críticas, com sinais de caquexia, elevada carga parasitária, presença de lesões cutâneas extensas e uma bala alojada no corpo, provavelmente decorrente de caça predatória anterior. Essas circunstâncias foram registradas com acompanhamento técnico durante a execução do projeto.

Foram analisadas 157 amostras biológicas provenientes de 116 indivíduos. Dessas, 56 eram soros, 9 eram fragmentos de tecido (fígado, n = 2; linfonodo mediastínico, n = 2; baço, n = 2; linfonodo submandibular, n = 2; linfonodo mesentérico, n = 1) e 92 eram swabs fecais.

Os animais foram coletados em três regiões da Mata Atlântica paulista entre 2013 e 2019, com a maioria das amostras obtidas em 2018 e 2019 (Figura 1; Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de amostras de soro, fezes e tecidos de *Tayassu pecari* coletadas entre 2013 e 2019 em três unidades da Mata Atlântica do estado de São Paulo (PEIC, PESM-SV e EEC).

	PEIC			PESM-SV			EEC			Total
	Soro	Fezes	Tecido	Soro	Fezes	Tecido	Soro	Fezes	Tecido	
<b>2013</b>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>
<b>2016</b>	12	1	-	-	-	-	-	-	-	<b>13</b>
<b>2017</b>	-	-	-	-	-	-	4	-	-	<b>4</b>
<b>2018</b>	13	13	-	13	27	9	1	22	-	<b>98</b>
<b>2019</b>	4	2	-	2	6	-	6	1	-	<b>21</b>
<b>Sem ano</b>	19	-	-	-	1	-	-	-	-	<b>20</b>
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>34</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>27</b>	<b>0</b>	<b>157</b>

PEIC, Cananéia; PESM-SV, São Luiz do Paraitinga; EEC, Gália

### **3.2 Caracterização das em três áreas da Mata Atlântica paulista (PEIC, PESM-SV e EEC)**

O monitoramento foi realizado em três unidades de conservação no Estado de São Paulo (Brasil) que representam gradientes distintos de posição geográfica, conectividade florestal e intensidade antrópica (Figura X).

#### **3.2.1 Parque Estadual da Ilha do Cardoso – PEIC (25°03' S, 47°54' W; Cananéia)**

Situado no extremo sul do estado, o PEIC abrange ~13 600 ha de remanescentes insulares de Mata Atlântica, com mosaico de restingas, manguezais, costões rochosos, florestas ombrófilas e estuários. A área, reconhecida pela UNESCO como Sítio do Patrimônio Mundial Natural e Reserva da Biosfera, protege mais de 980 espécies vegetais e diversas espécies-chave (queixada, bugio-ruivo, lontra-neotropical, jacaré-de-papo-amarelo e aves ameaçadas). A baixa acessibilidade e o manejo participativo das comunidades caiçaras favorecem a conservação e possibilitam Turismo de Base Comunitária<sup>34</sup>.

#### **3.2.2 Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – PESM-SV (23°18' S, 45°08' W; São Luiz do Paraitinga)**

Com ~17 500 ha distribuídos nos municípios de São Luiz do Paraitinga, Natividade da Serra, Cunha, Ubatuba e Caraguatatuba, o núcleo protege cabeceiras do rio Paraibuna e mantém corredores de biodiversidade da Serra do Mar. Predominam florestas tropicais primárias ou pouco alteradas, que sustentam populações de muriqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*), anta (*Tapirus terrestris*) e onça-pintada (*Panthera onca*)<sup>35</sup>.

#### **3.2.3 Estação Ecológica dos Caetetus – EEC (22°24' S, 49°38' W; Gália/Alvinlândia)**

Último grande remanescente de floresta estacional semidecidual do Planalto Ocidental Paulista, a EEC soma 2 178,8 ha isolados por matriz agropecuária intensiva (< 6 % de cobertura original restante). O fragmento abriga espécies ameaçadas como mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), suçuarana (*Puma concolor*) e anta<sup>36</sup>.

### 3.3 Processamento das amostras

#### 3.3.1 Soro e tecido

Para o soro, utilizaram-se alíquotas de 200 µL, previamente armazenadas a -80 °C. Os tecidos (fígado, baço e linfonodos) foram macerados em solução salina estéril a 0,9%, na proporção aproximada de 20% p/v, até obter suspensões homogêneas. Tanto as amostras líquidas quanto as suspensões de tecido foram então submetidas ao protocolo de extração de ácidos nucleicos (DNA/RNA) com o EasyPure® Viral DNA/RNA Kit (TransGen Biotech), seguindo integralmente as recomendações do fabricante.

Todas as amostras passaram por uma PCR qualitativa direcionada ao gene ACTB ( $\beta$ -actina). A PCR para amplificação de um fragmento de 850 pb do gene  $\beta$ -actina foi preparada em 25 µL, contendo: 2,5 µL de DNA extraído; 12,5 µL de Master Mix Taq Pol 2x (Cellco, EUA); 10 pmol de cada primer (AC1: 5'- TGA GAC CTT CAC GCC-3' e AC2: 5'- ATC TGC AAG GTG GAC- 3') descritos por Hui et al. (2024)<sup>37</sup>; e água livre de nucleases para completar o volume. Água ultrapura estéril serviu como controle negativo tanto da extração quanto da reação.

As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti™ Dx 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 50 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, finalizando com extensão a 72 °C por 10 min.

Os amplicons gerados foram separados em gel de agarose a 1,5 %, corados com GelRed® (Biotium) e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi comparado a um marcador de 100 pb (Invitrogen).

#### 3.3.2 Swabe fecal

Para as amostras de swab retal, os swabs foram homogeneizados em tubos contendo 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) estéril, com posterior agitação em vortex por 30 segundos. Após esse processo, os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Um volume de 200 µL do sobrenadante foi então utilizado para a extração do ácido nucleico com o kit MagMAX *Core-Nucleic acid purification* (Thermo Fisher Scientific,

EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

Todas as amostras de suabe fecal foram submetidas a uma PCR qualitativa direcionado para o gene do 18S rRNA utilizando os *primers* 519A e 907B, que amplificam um fragmento de  $\approx$  388 pb.

Cada reação de PCR foi feita em volume final de 25  $\mu$ L, contendo 2,5  $\mu$ L de DNA extraído, 12,5  $\mu$ L de Master Mix Taq Pol 2x (Cellco, EUA) e 10 pmol de cada *primer*, 519A (5'-CAG C(A/C)GC CGC GGT AAT-3') e 907B (5'-CCG TCA ATT C(A/C)TT T(A/G)AG TTT-3')<sup>38</sup>.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, foram corados com GelRed® (Biotium) e foram visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Invitrogen).

### **3.4 Validação da Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) multiplex para diferenciação de PCV2a e PCV2b**

#### **3.4.1 Controles positivos**

Os controles positivos dos genótipos PCV2a e PCV2b foram obtidos por síntese comercial (Life Tech Brasil). Para cada genótipo, sintetizou-se um fragmento de 208 pb (PCV2a) ou 211 pb (PCV2b) que abrange as regiões de ancoragem dos primers e da sonda. Esses fragmentos foram clonados no vetor pMK-RQ (Kan<sup>R</sup>) e transformados em *Escherichia coli* K-12 DH10B™ T1<sup>R</sup>. O DNA plasmidial extraído a partir das colônias transformadas foi purificado, quantificado por espectrofotometria e sequenciado. Em seguida, 5  $\mu$ g de cada plasmídeo foram liofilizados.

No Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), a liofilização foi ressuspensa em 10  $\mu$ L de água livre de nucleases, produzindo soluções-estoque com  $2,54 \times 10^{12}$  cópias/ $\mu$ L (PCV2a) e  $2,52 \times 10^{12}$  cópias/ $\mu$ L (PCV2b).

A partir dessas soluções, prepararam-se diluições decimais sucessivas que foram usadas de base para a construção da curva padrão (Quadro 1).

**Quadro 1.** Diluição seriada da curva padrão com seus respectivos números de cópias de DNA calculados para PCV2a e PCV2b.

Cópias de DNA		Diluição (denominação própria)
PCV2a	PCV2b	
$2,54 \times 10^6$	$2,52 \times 10^6$	1
$2,54 \times 10^5$	$2,52 \times 10^5$	2
$2,54 \times 10^4$	$2,52 \times 10^4$	3
$2,54 \times 10^3$	$2,52 \times 10^3$	4
$2,54 \times 10^2$	$2,52 \times 10^2$	5
$2,54 \times 10^1$	$2,52 \times 10^1$	6

### 3.4.2 Condições de reação

Os ensaios serão realizados utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems). O par de *primers* e a sonda estão descritos no quadro 2.

**Quadro 2.** Relação do par de *primers* e sonda que serão empregados nas qPCR de acordo com a posição do nucleotídeo (nt)35.

Identificação	Alvo	Sequência (5' → 3')	Sonda
<b>PCV2ab SGF</b>	PCV2a/PCV2b	GGC GGT GGA CAT GAT GAG A	-
<b>PCV2ab SGR</b>	PCV2a/PCV2b	GCA GGG CCA GAA TTC AAC C	-
<b>PCV2 1484</b>	PCV2a	GGG GAC CAA CAA AAT CTC TAT ACC CTT T	VIC
<b>PCV2 1480</b>	PCV2b	CTC AAA CCC CCG CTC TGT GCC C	FAM

As reações de qPCR foram otimizadas quanto à combinação de primers e sonda e foram executadas em um sistema QuantStudio 3 Real-Time PCR® (Applied Biosystems). Todas as amostras foram analisadas em triplicata, acompanhadas de controles negativos específicos para cada par de *primiers* e sonda.

Para a quantificação absoluta, construiu-se uma curva-padrão a partir de cinco diluições decimais sucessivas do plasmídeo-padrão. O software do equipamento gerou

a regressão linear entre os valores de  $Ct$  e o  $\log_{10}$  da concentração e forneceu o coeficiente angular (*slope*). A eficiência ( $\epsilon$ ) foi calculada pela equação  $\epsilon = 10^{(-1/slope)} - 1$ ; um *slope* próximo de  $-3,3$  indica eficiência de aproximadamente 100 %, refletindo a duplicação do número de moléculas a cada ciclo da PCR quantitativa

O limiar de fluorescência (*threshold*) foi ajustado automaticamente pelo QuantStudio 3 com base nos  $Ct$  registrados para cada diluição. Selecionaram-se as cinco diluições (Quadro 1) com maior linearidade e reprodutibilidade para referência na determinação da carga viral de PCV2a e PCV2b.

### **3.5 Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) multiplex para diferenciação de PCV2a e PCV2b**

A PCR quantitativa foi conduzida em volume final de 25  $\mu$ L, composto por 2,5  $\mu$ L de DNA, 13  $\mu$ L de TaqMan™ Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,5  $\mu$ L da sonda específica para PCV2a ou PCV2b (Quadro 1), 1  $\mu$ L de cada primer (Quadro 1) e 7  $\mu$ L de água Milli-Q estéril.

As reações foram amplificadas a 50 °C por 2 min, seguidas de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. As análises foram realizadas no sistema StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Em cada placa, incluiu-se uma curva-padrão de cinco pontos e um controle negativo de reação, garantindo validação e rastreabilidade dos ensaios.

A carga viral foi expressa em cópias de DNA por suabe fecal e por mililitro de soro ou de tecido macerado. Os dados de quantificação das diferentes amostras (soros, suabes e macerado de tecido) foram transformados em log da base 10 para análise estatística.

### **3.6. Análise estatística**

Todos os registros foram organizados no Microsoft Excel 365, ambiente em que se obtiveram as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas (tipo de amostra, unidade de conservação e ano de coleta) e se construíram gráficos descritivos.

A prevalência foi calculada como  $n/N$ , acompanhada do intervalo de confiança de 95 % estimado pelo método exato de Clopper-Pearson, adequado a tamanhos amostrais pequenos. A homogeneidade das proporções entre áreas foi avaliada pelo teste qui-quadrado de independência ( $\alpha = 0,05$ ); quando alguma frequência esperada foi  $< 5$ , aplicou-se o teste exato de Fisher, também utilizado nas comparações par-a-par com cálculo da razão de chances. Esses procedimentos foram executados no R 4.5.1.

Para investigar simultaneamente o efeito do tipo de amostra e da localidade sobre a PCR-positividade, ajustou-se um modelo GEE binomial (ligação logito, estrutura de correlação exchangeable), agrupando observações repetidas pelo identificador do animal; “fezes” e “EEC” serviram como categorias-referência. As razões de chances (OR =  $e^{\beta}$ ) e seus IC 95 % foram obtidas no Python 3.11 com o módulo *statsmodels*, adotando-se  $p < 0,05$  como critério de significância.

## 4.RESULTADOS

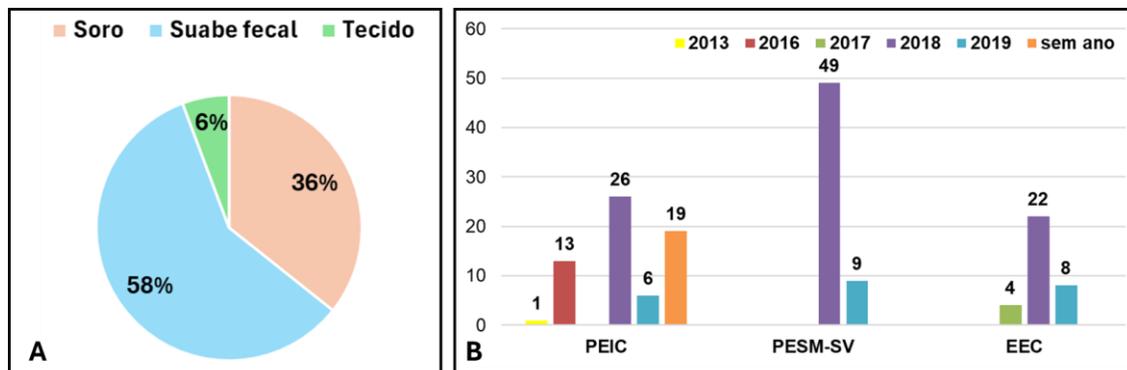
### 4.1 Caracterização das amostras

Foram analisadas 157 amostras biológicas provenientes de 116 indivíduos de *Tayassu pecari* capturados entre 2013 e 2019 em três áreas da Mata Atlântica paulista (PEIC, PESM-SV e EEC).

Na figura 2A, observa-se que a maior parte do material correspondeu a swabes fecais (91/157; 58 %), seguida por amostras de soro (57/157; 36 %) e fragmentos de tecido (9/157; 6 %).

A figura 2 B revela um forte viés temporal e espacial: o pico amostral ocorreu em 2018, quando foram obtidas 97 amostras (61,8 % do total), com predominância do PESM-SV, 49 amostras. Em 2019 o esforço caiu para 23 amostras, mas, somados, 2018 e 2019 concentraram 120 amostras (76,4 % do total do estudo). O PEIC apresentou a série histórica mais longa, contribuindo com 65 amostras (41,4 %) distribuídas por 2013, 2016, 2018 e 2019, além de 19 registros sem data definida; a EEC respondeu por 34 amostras (21,7 %), principalmente em 2018 (n = 22) e 2019 (n = 8), sendo 2017 (n = 4) o único ano exclusivo dessa localidade. Registros esparsos de 2013 (n = 1) e 2017 (n = 4) indicam coletas pontuais.

**Figura 2** - Caracterização das amostras de *Tayassu pecari* coletadas no estado de São Paulo. (A) Percentual de cada tipo de material biológico (soro, suabe fecal e tecido). (B) Distribuição do número de amostras por unidade de conservação (PEIC, PESM-SV e EEC) e por ano de coleta (2013–2018).



#### 4.2 Controle de qualidade da extração e PCR endógena

Para avaliar a qualidade do ácido nucleico extraído, as amostras de soro e tecido foram submetidas à amplificação do gene  $\beta$ -actina, enquanto as amostras de suabe fecal foram avaliadas por meio da amplificação de um fragmento do gene 18S rRNA.

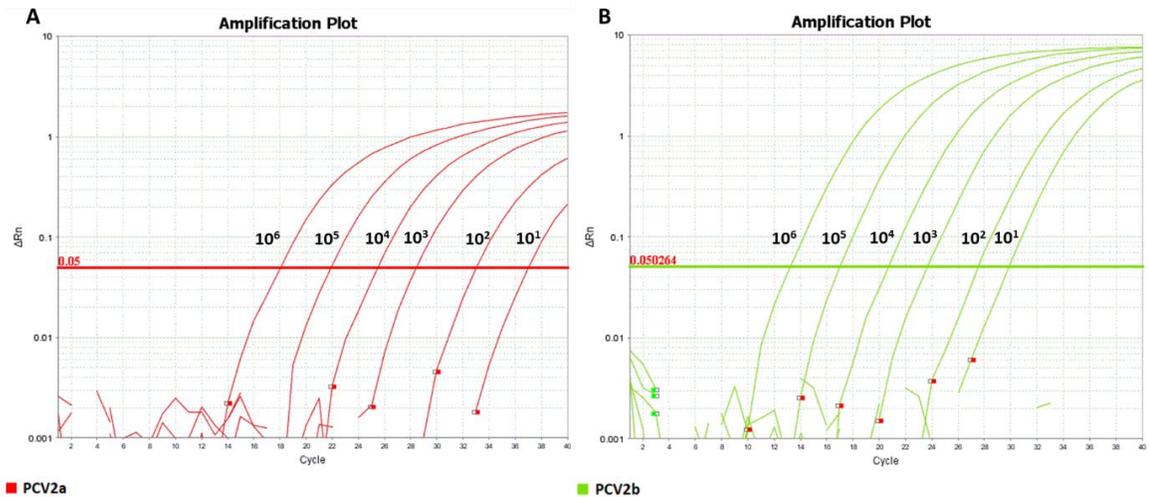
Em ambos os ensaios-controle, 100 % das reações apresentaram amplificação positiva, evidenciada por bandas únicas no tamanho esperado após eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, coradas com GelRed® e comparadas a um marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4.3 Validação da Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq) multiplex para diferenciação de PCV2a e PCV2b

A Figura 3 demonstra que a qPCR multiplex para PCV2a (A) e PCV2b (B) apresenta ampla faixa dinâmica: as curvas de amplificação mantêm linearidade consistente entre  $10^6$  e  $10^1$  cópias  $\mu$ L, abrangendo seis ordens de magnitude. O limite de detecção correspondeu à sexta diluição, permitindo detectar  $2,54 \times 10^1$  e  $2,52 \times 10^1$  cópias de DNA  $\mu$ L para PCV2a e PCV2b, respectivamente. Para ambos os genótipos, o ciclo 40 foi definido como ponto de corte, garantindo que apenas curvas exponenciais verdadeiras fossem consideradas positivas.

O espaçamento médio de  $\sim 3,3$  ciclos, entre diluições sucessivas, indicam eficiência próxima de 100 %, em concordância com os valores de *slope* e  $R^2$  listados na Tabela 3.

**Figura 3** - Curva padrão da PCR em tempo real para a detecção de região da ORF2 de PCV2a (A) e PCV2b (B). Diluições na base 10 do DNA plasmidial clonado em concentração de  $10^6$  cópias de DNA/ $\mu$ L a  $10^1$  cópias de DNA/ $\mu$ L evidenciando a menor diluição capaz de evidenciar o sinal da reação



A Tabela 2 demonstra a alta precisão intra-ensaio: os desvios-padrão variam de 0,7 e 1,2 ciclo e, permanecendo abaixo do limite de 1,5 Ct recomendado para qPCR mesmo na menor diluição ( $10^1$  cópias).

A maior dispersão foi observada nos extremos da curva-padrão ( $10^4$  e  $10^1$  cópias), efeito esperado pela proximidade do limite de detecção. Nas diluições intermediárias ( $10^2$  a  $10^5$  cópias) o DP cai para 0,7-0,9 ciclo, reforçando a robustez da quantificação em todo o intervalo de  $10^6$  a  $10^1$  cópias  $\mu\text{L}$ .

**Tabela 2** – Valores de Ct e desvio-padrão intra-ensaio para cada diluição da curva-padrão dos genótipos PCV2a e PCV2b.

Diluições	Agente	Ct-R1	Ct-R2	Ct-R3	Média Ct	DP (ciclos)
$10^6$	PCV2a	20,0	21,0	19,7	20,3	0,7
	PCV2b	16,9	20,3	20,8	19,3	2,1
$10^5$	PCV2a	22,0	23,0	23,2	22,8	0,7
	PCV2b	20,7	22,4	24,7	22,6	2,0
$10^4$	PCV2a	25,4	26,3	27,3	26,3	1,0
	PCV2b	24,0	25,7	28,2	26,0	2,1
$10^3$	PCV2a	29,3	30,0	31,2	30,2	0,9
	PCV2b	27,3	28,9	32,5	29,6	2,6
$10^2$	PCV2a	32,9	34,1	34,2	33,8	0,7

	<b>PCV2b</b>	31,5	32,7	34,9	33,0	1,7
<b>10<sup>1</sup></b>	<b>PCV2a</b>	35,6	37,6	37,9	37,0	1,2
	<b>PCV2b</b>	35,2	37,6	38,7	37,2	1,7

A eficiência da amplificação foi determinada pela equação  $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})}$ . Os parâmetros obtidos, *slope*, eficiência ( $\epsilon$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foram estimados para três execuções independentes. Os valores consolidados estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 4.

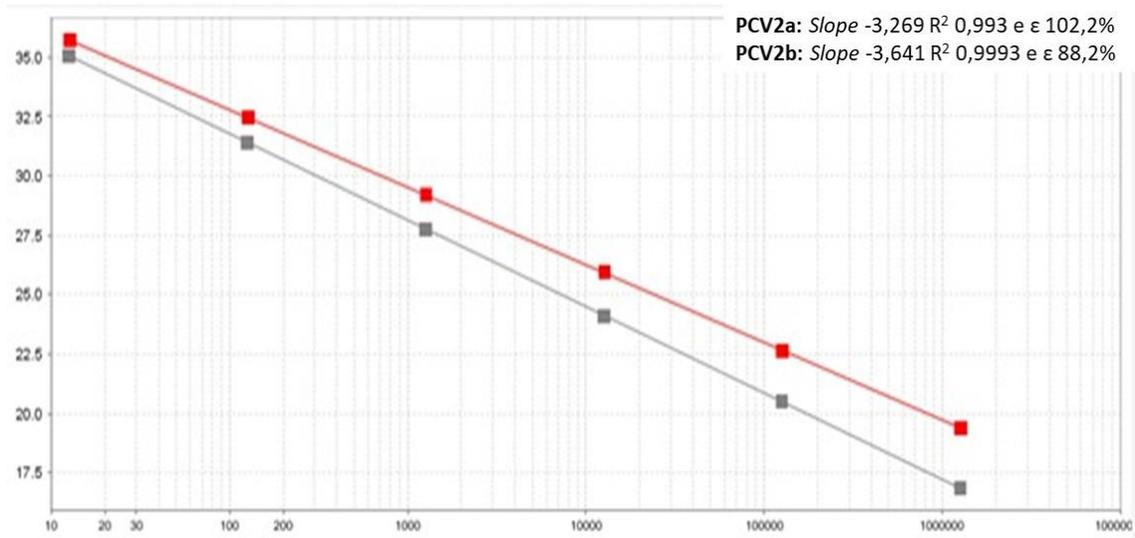
Para o genótipo PCV2a, o *slope* de -3,269 gera eficiência de 102 % e  $R^2 = 0,993$ ; para PCV2b, o *slope* de -3,641 resulta em eficiência de 88 % e  $R^2 = 0,9993$ . Esses valores confirmam linearidade robusta ao longo de seis ordens de magnitude ( $10^1$ - $10^6$  cópias  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

**Tabela 3** – Parâmetros da curva-padrão da qPCR multiplex para PCV2.

		<i>slope</i>	$R^2$	$\epsilon$ (eficiência) (%)
<b>Reação 1</b>	PVC2a	-3,3	0,993	102,2
	PVC2b	-3,6	0,999	88,2
<b>Reação 2</b>	PVC2a	-3,4	0,991	95,9
	PCV2b	-3,4	0,985	95,1
<b>Reação 3</b>	PVC2a	-3,6	0,999	87,9
	PVC2b	-3,6	0,994	89,9

As correspondentes retas de regressão log (cópias)  $\times$  *Ct* são ilustradas na Figura 4, onde se observa a sobreposição quase paralela das inclinações, corroborando a confiabilidade do protocolo multiplex para a quantificação dos dois genótipos.

**Figura 4** - Retas de regressão das curvas-padrão de PCV2a e PCV2b. Legenda: Pontos vermelhos (PCV2a) e Pontos cinzas (PCV2b) correspondem as diluições na base 10 do DNA plasmidial clonado em concentração de  $10^6$  a  $10^1$  cópias de DNA/  $\mu\text{L}$ .



#### 4.4 Detecção e quantificação PCV2a e PCV2b nas amostras clínicas

Na EEC nenhuma das 48 amostras coletadas apresentou amplificação para os genótipos estudados, sugerindo ausência de circulação viral detectável nessa região durante o período analisado.

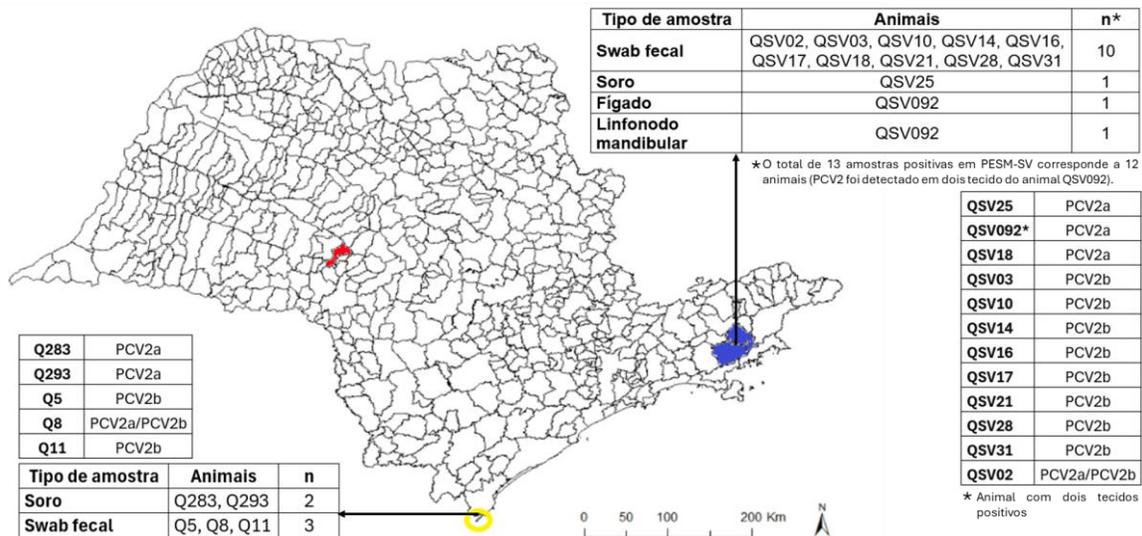
PCV2 foi detectado em duas das três unidades de conservação investigadas (Figura 5). A maior concentração de casos ocorreu no PESM-SV, que apresentou uma taxa de positividade de 27,1 % (13/48) e respondeu por 72 % (13/18) de todos os animais PCR-positivos do estudo.

Nessa área o vírus apareceu sobretudo em swabs fecais (10 animais); apenas um soro e um par de tecidos (fígado e linfonodo mandibular do mesmo indivíduo) também apresentaram amplificação. Ambos os genótipos foram detectados, com predomínio de PCV2b em 61,5 % (8/13) das amostras; PCV2a ocorreu em 30,8 % (4/13), e 7,7 % (1/13) das amostras exibiu coinfeção PCV2a/PCV2b.

No EEC (Figura 5), foram analisadas 78 amostras e apenas cinco apresentaram PCR positiva para PCV2, resultando em uma taxa de positividade de 6,4 %. A maioria dos achados concentrou-se em swabs fecais (três animais), enquanto os demais ocorreram em soro (dois animais); nenhum tecido proveniente da ilha amplificou. Em termos genotípicos, o vírus apareceu de forma equilibrada: PCV2b foi detectado em três animais (todos em swab fecal, incluindo um caso de coinfeção) e PCV2a em três (dois

soros e o mesmo swab coinfectedos), evidenciando a circulação simultânea dos dois genótipos.

**Figura 5** – Localização dos animais positivos para PCV2 no estado de São Paulo. O mapa mostra as três unidades de conservação amostradas: PEIC – Ilha do Cardoso (círculo amarelo), PESM-Núcleo Santa Virgínia (polígono azul) e EEC – Caetetus (estrela vermelha). Os quadros laterais detalham, para cada área: (i) os tipos de amostra que apresentaram PCR positiva, (ii) os respectivos animais identificados e (iii) o número de indivíduos (n). À direita, a lista de amostras positivas em Santa Virgínia inclui o genótipo detectado; à esquerda, aparecem os resultados do PEIC. Nenhum animal testou positivo na EEC.



As 20 amostras positivas revelam valores de *Ct* entre 36,0 e 38,5 ciclos, com mediana aproximada de 37,1. Os menores *Ct* (36,0-36,5), indicativos das cargas mais altas, concentraram-se em swabs fecais positivos para PCV2b; incluindo o animal Q5 da Ilha do Cardoso ( $1,27 \times 10^3$  cópias  $\mu\text{L}$ ,  $\log_{10} = 3,1$ ) e os espécimes QSV10 e QSV14 de Santa Virgínia ( $\approx 1,0-1,1 \times 10^3$  cópias  $\mu\text{L}$ ,  $\log_{10} = 3,0-3,1$ ). Por outro lado, os *Ct* mais elevados (38,1-38,5) ocorreram em soros positivos para PCV2a, cuja carga absoluta variou de  $5,3 \times 10^2$  a  $6,2 \times 10^2$  cópias  $\mu\text{L}$  ( $\log_{10} \approx 2,7-2,8$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4-** Resultados de PCR em Tempo Real para Detecção de PCV2a e PCV2b em

Amostras de Animais Silvestres de Três Unidades de Conservação no Estado de São Paulo.

Animal	Amostra	Ano	Local	Alvo	Ct Médio	Quant Absoluta	Log <sub>10</sub>
<b>Q283</b>	Soro	-	PEIC	PCV2a	38,1	6,17E+02	2,8
<b>Q293</b>	Soro	-	PEIC	PCV2a	38,5	5,27E+02	2,7
<b>QSV25</b>	Soro	2018	PESM-SV	PCV2a	37,6	7,15E+02	2,9
<b>*QSV092</b>	Fígado	2018	PESM-SV	PCV2a	38,4	5,56E+02	2,7
<b>*QSV092</b>	Linf Mand*	2018	PESM-SV	PCV2a	36,7	9,82E+02	3,0
<b>QSV02</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2a	38,1	6,17E+02	2,8
<b>QSV02</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	37,1	8,60E+02	2,9
<b>QSV03</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	37,0	8,83E+02	2,9
<b>QSV10</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	36,5	1,04E+03	3,0
<b>QSV14</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	36,3	1,14E+03	3,1
<b>QSV16</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	36,9	9,10E+02	3,0
<b>QSV17</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	37,2	8,28E+02	2,9
<b>QSV18</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2a	37,0	8,77E+02	2,9
<b>QSV21</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	36,8	9,41E+02	3,0
<b>QSV28</b>	Swab Fecal	2018	PESM-SV	PCV2b	37,0	8,96E+02	3,0
<b>QSV31</b>	Swab Fecal	2019	PESM-SV	PCV2b	37,0	8,87E+02	2,9
<b>Q5</b>	Swab Fecal	2016	PEIC	PCV2b	36,0	1,27E+03	3,1
<b>*Q8</b>	Swab Fecal	2016	PEIC	PCV2a	37,8	6,85E+02	2,8
<b>*Q8</b>	Swab Fecal	2016	PEIC	PCV2b	38,1	6,20E+02	2,8
<b>Q11</b>	Swab Fecal	2016	PEIC	PCV2b	36,9	9,14E+02	3,0
				<b>8+</b>			
				<b>PCV2a.</b>			
				<b>12+</b>			
<b>Total</b>	<b>19 amostras</b>			<b>PCV2b</b>			

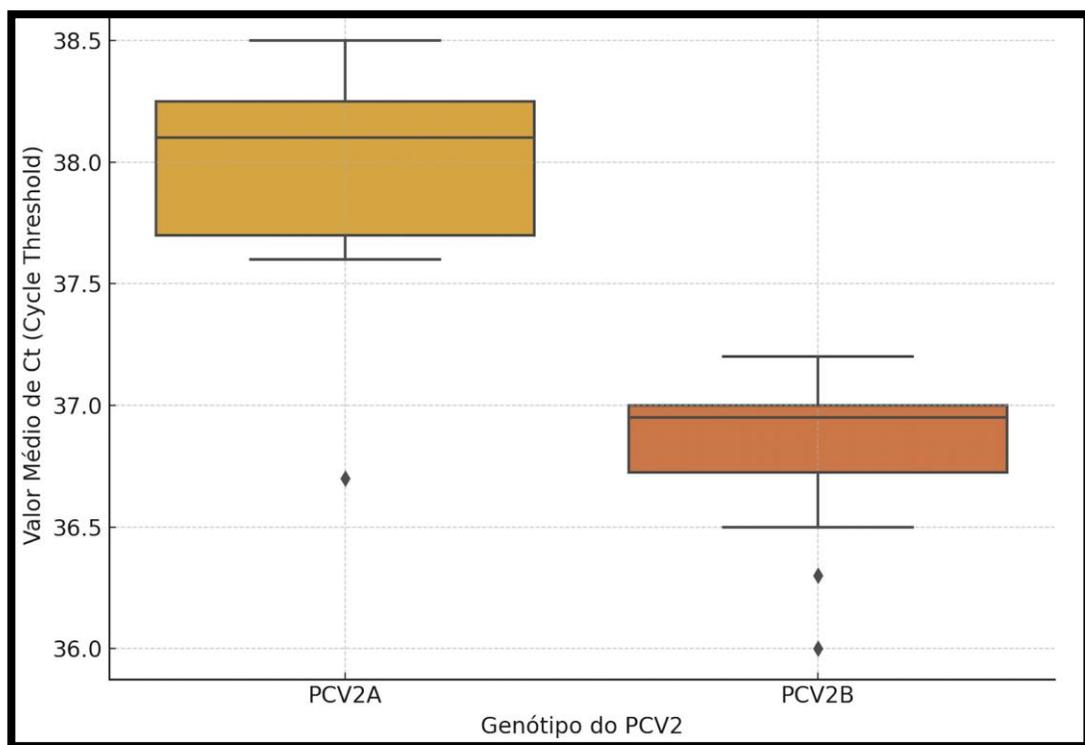
\* Linf Mand= Linfonodo submandibular.

\*As amostras QSV092 referem-se ao mesmo animal, porém amostras diferentes, com dois tecidos positivos para PCV2a

\*As amostras Q8 referem -se ao mesmo animal, mesmas amostras, porém com resultados positivos para PCV2a e PCV2b

A distribuição sugere que PCV2b tende a apresentar cargas ligeiramente superiores, pois nenhum Ct desse genótipo ultrapassou 37,2 ciclos, enquanto PCV2a apareceu até 38,5 (Figura 6). Mesmo assim, a amplitude total de cargas foi estreita, de  $5,3 \times 10^2$  a  $1,3 \times 10^3$  cópias  $\mu\text{L}$  ( $\log_{10} = 2,7-3,1$ ), o que confirma infecções de baixa intensidade em ambas as populações amostradas.

**Figura 6.** Distribuição dos valores médios de Ct (Cycle Threshold) por genótipo viral (PCV2a e PCV2b) detectados em *Tayassu pecari*.



Nos tecidos de QSV092 (fígado e linfonodo mandibular) as cargas oscilaram entre  $5,6 \times 10^2$  e  $9,8 \times 10^2$  cópias  $\mu\text{L}$  (Ct 38,4 e 36,7, respectivamente), valores compatíveis com a viremia limitada observada nos soros. Assim, embora a positividade se espalhe por matrizes diversas, swabs fecais permanecem a fonte mais sensível, refletindo maior eliminação viral no trato gastrointestinal dos queixadas.

A análise estatística não revelou associação global entre a unidade de conservação e o resultado da PCR (qui-quadrado de independência:  $\chi^2 = 2,90$ ; gl = 2;  $p = 0,235$ ). Nas comparações par a par (teste exato de Fisher), a probabilidade de

detecção na PESM-SV foi 3,1 vezes maior que na EEC (OR = 3,12;  $p = 0,046$ ), porém não diferiu significativamente do PEIC (OR = 2,06;  $p = 0,156$ ); PEIC e EEC também não diferiram entre si ( $p = 0,748$ ). Esses achados sugerem apenas uma tendência de maior circulação viral em PESM-SV, exigindo amostragens adicionais ou outras abordagens para confirmação.

No modelo GEE binomial (Tabela 5), o tipo de amostra permaneceu o principal preditor de PCR-positividade. Amostras de soro apresentaram 81,6 % ( $\approx 82$  %) menor chance de detecção em comparação a fezes (OR = 0,18;  $p = 0,011$ ). Tecidos não diferiram de fezes (OR = 0,69;  $p = 0,675$ ). Em relação ao local de coleta, nem o PEIC (OR = 1,89;  $p = 0,345$ ) nem o PESM-SV (OR = 2,77;  $p = 0,111$ ) diferiram significativamente da EEC, indicando que a evidência para variação espacial permanece limitada e deve ser interpretada com cautela.

**Tabela 5-** Associação entre tipo de amostra ou local de coleta e chance de PCR-positividade para PCV2 em *Tayassu pecari* (modelo GEE binomial, cluster = indivíduo).

Variável (referência)	OR (IC 95 %)	$p$
<b>Soro x Fezes</b>	0,18 (0,05 – 0,68)	0,011
<b>Tecido x Fezes</b>	0,69 (0,12 – 3,87)	0,675
<b>PEIC x EEC</b>	1,89 (0,50 – 7,15)	0,345
<b>PESM-SV x EEC</b>	2,77 (0,79 – 9,71)	0,111

## 5. DISCUSSÃO

O Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2), pertencente gênero Circovirus da família *Circoviridae*, é um vírus de DNA não envelopado. Desde sua descrição em 1998, consolidou-se como o principal agente do complexo de doenças associado a circovírus suíno (PCVAD), responsável por perdas produtivas significativas na suinocultura mundial<sup>40</sup>. O vírus apresenta elevada variabilidade genética: oito genótipos (PCV2a-2h)<sup>41,42</sup>, já foram descritos, com predominância global de PCV2a, PCV2b e, mais recentemente, PCV2d<sup>43</sup>. Essa diversidade decorre de uma taxa de mutação alta para vírus de DNA ( $1,2 \times 10^{-3}$  e  $6,6 \times 10^{-3}$  substituições/sítio/ano), e possivelmente, da pressão seletiva imposta pela vacinação em larga escala<sup>43</sup>. Apesar da adoção de vacinas comerciais, que reduziram a morbimortalidade e carga viral, o PCV2 mantém-se endêmico e continua gerando preocupação sanitária e econômica<sup>44</sup>.

O PCV2 também demonstra notável capacidade de transpor barreiras de espécie, tendo sido detectado naturalmente em roedores, ruminantes, cães, carrapatos, moluscos e até em amostras ambientais<sup>45,46</sup>. Infecções experimentais comprovam replicação viral com soroconversão e lesões em camundongos e bezerros<sup>47</sup>, evidenciando que o tropismo do vírus não se restringe à família *Suidae*. Essa plasticidade, aliada à estabilidade ambiental do vírus e ao período prolongado de eliminação pelos animais infectados<sup>48</sup>, ressalta a importância de monitorar PCV2 em ecossistemas naturais.

Este estudo é a primeira demonstração molecular da circulação simultânea de PCV2a e PCV2b em populações silvestres de *Tayassu pecari*. Entre 157 amostras coletadas entre 2013 e 2019 em três unidades de conservação da Mata Atlântica, 19 (11 %) foram positivas, distribuídas em 17 animais distintos. As cargas variaram de  $5,3 \times 10^2$  a  $1,3 \times 10^3$  cópias  $\mu\text{L}$  ( $\log_{10}$  2,7 – 3,1), valores compatíveis com infecções subclínicas em suínos domésticos, nas quais a eliminação viral pode persistir por várias semanas<sup>49</sup>. A presença de DNA viral em swab fecal, soro e tecido reforça a hipótese de infecção sistêmica, embora de baixa intensidade<sup>50</sup>. Esse achado adquire maior relevância ao se considerar que apenas 6,6 % dos 122 estudos epidemiológicos sobre ungulados neotropicais abordam virologia e nenhum havia investigado circovírus em pecarídeos de vida livre<sup>51,52</sup>.

A qPCR multiplex empregada neste trabalho foi validada segundo os princípios de Markoulatos et al<sup>53</sup>, assegurando pareamento de Tm dos *primers*, balanço de *primers* e controle da concentração de MgCl<sub>2</sub> para evitar competição entre alvos. As curvas padrão foram lineares ( $R^2 \geq 0,997$ ) com inclinações de -3,35 para PCV2a e -3,29 para PCV2b, correspondendo a eficiências de amplificação de 98,6 % e 101,8 %, respectivamente. O limite de detecção foi de 5 cópias por reação para ambos os genótipos, e a reprodutibilidade manteve-se abaixo de 1 % (intra-ensaio) e de 2 % (inter-ensaio). Todas as 157 amostras amplificaram positivamente os controles endógenos  $\beta$ -actina (soro/tecido) ou 18S rRNA (swab fecal), confirmando integridade do ácido nucleico e ausência de inibidores<sup>54</sup>.

O perfil genotípico das amostras mostrou predomínio de PCV2b em 12/19 amostras positivas, consistente com a expansão global após o *genotype shift* de 2000-2005<sup>55</sup>. Os valores de Ct mais baixos para PCV2b (36,0 - 37,1) incidam  $\approx 0,3 \log_{10}$  cópias adicionais em relação a PCV2a; experimentalmente, PCV2b atinge picos de viremia mais altos e permanece detectável por mais tempo<sup>56</sup>. A elevada proporção de detecções em swabs fecais (83 %) confirma a sensibilidade dessa amostra para circovírus, como já descrito por Jacobsen *et al.* (2009)<sup>57</sup>, e sugere que a via fecal-oral possa sustentar a circulação viral entre queixadas.<sup>58</sup> As cargas virais moderadas ( $\log_{10}$  2,7 - 3,1) coincidem com valores típicos de infecções subclínicas em suínos<sup>59</sup>, reforçando a hipótese de que populações de *Tayassu pecari* atuem como reservatório silencioso de PCV2.

Sob a perspectiva de Uma Só Saúde, esses achados são críticos. A interface entre fauna silvestre, comunidades tradicionais e suinocultura de subsistência, comum em Cananéia e no Vale do Paraíba, favorece eventos de transmissão interespecíficas. A predominância de PCV2b, genótipo também dominante em suínos domésticos, sugere fluxo viral da produção comercial para a fauna; porém, um *spillback* não se pode descartar se pecarídeos mantiverem o vírus persistentemente<sup>60</sup>. Embora a infecção humana não esteja clinicamente documentada, já se detectaram antígenos e fragmentos genômicos de PCV2 em amostras humanas e em vacinas contaminadas, reforçando a necessidade de vigilância<sup>29,30</sup>.

A qPCR multiplex validada, com limite de detecção de apenas 5 cópias por reação e coeficientes de variação < 2 %, constitui ferramenta sensível para genotipagem

em amostras de qualidade variável. Nos programas de vigilância, swabs fecais devem ser amostra prioritária pela maior sensibilidade para circovírus<sup>61</sup>. Essas amostras podem ser coletadas com contenção mínima e dispensam centrifugação, vantagens decisivas em unidades de conservação de acesso difícil. Ensaio de campo demonstram, ainda, que o DNA de PCV2 permanece estável por até 72 h à temperatura ambiente em meios de transporte validados para swab fecal, enquanto amostras de soro exigem captura, sedação e processamento imediato, restringindo o tamanho amostral e elevando os custos operacionais (Dos Santos *et al.*, 2020; DOI 10.1186/s40813-020-00168-w). Tecidos oferecem sensibilidade intermediária, mas seu uso depende de necropsias oportunísticas e de manutenção refrigerada para evitar degradação<sup>62</sup>. Assim, o protocolo recomendado para fauna silvestre prioriza swabs fecais individuais, complementados por soro apenas em contenções planejadas e por tecidos quando carcaças estiverem disponíveis, estratégia que reproduz a prática consolidada em granjas, onde fezes ou fluidos orais substituem rotineiramente o soro como amostra de triagem<sup>63,64</sup>.

Entre 2013 e 2019, 76 % das amostras foram obtidas no biênio 2018-2019. Desse total, 61,8 % (97/157) concentraram-se em 2018 e 14,6 % (23/157) em 2019. A distribuição espacial refletiu esse mesmo desequilíbrio: PESH-Santa Virgínia respondeu por 58 amostras (36,9 %), PEIC por 45 (28,7 %) e EEC por 34 (21,7 %). Assim, a maior proporção de amostras, e, conseqüentemente, de detecções de PCV2, no PESH-SV deve ser interpretada principalmente como resultado do esforço amostral intensificado, não necessariamente como indicativo de pressão de infecção mais alta.

A baixa positividade na EEC (4/34; 11,8 %) pode refletir três fatores: (i) menor número absoluto de coletas; (ii) densidade reduzida de queixadas em um fragmento de apenas 2 178 ha isolado por agropecuária, com < 6 % da cobertura florestal original; e (iii) contato limitado com suínos domésticos ou javalis, reconhecidos reservatórios de PCV2<sup>65</sup>. Para distinguir se a variação é puramente amostral ou ecológica, próximos inquéritos devem equalizar o esforço de captura entre unidades e incorporar métricas independentes, densidade de queixadas, abundância de javalis e proximidade a criações familiares de suínos, conforme recomendado por estudos de interface suíno-fauna que descrevem fluxo bidirecional de PCV2 entre javalis e plantéis domésticos<sup>66</sup>.

Embora robusta, a presente investigação possui restrições que justifiquem futuros estudos. o presente estudo avaliou queixadas (*Tayassu pecari*) apenas na Mata Atlântica, deixando sem exploração biomas onde a espécie também ocorre, Cerrado, Pantanal e, historicamente, Caatinga. Nessas paisagens, a proximidade com javalis e criações suínas pode alterar a dinâmica do PCV2, pois a prevalência viral varia conforme matriz agroflorestal e uso do solo<sup>67</sup>. Além disso, não foi realizado histopatologia nem sorologia, limitando a distinção entre infecção ativa e exposição pregressa, abordagem já aplicada a javalis europeus (Vicente et al., 2021; DOI 10.1007/s10393-021-01538-9).

Investigações futuras devem ampliar a amostragem de queixadas a esses biomas, incluir avaliações histopatológicas e sorológicas e recorrer a metagenômica de nova geração para rastrear genótipos emergentes, como PCV2d, já detectados em focos periféricos antes de atingir rebanhos comerciais<sup>68</sup>. A integração de dados moleculares dos queixadas com variáveis ambientais de alta resolução, cobertura vegetal, densidade de javalis, proximidade de granjas, em modelos preditivos permitirá mapear zonas de risco, orientar biossegurança em unidades de conservação e, sobretudo, proteger esta espécie social e ecologicamente chave contra potenciais impactos sanitários.

## 6 CONCLUSÃO

Foi constatada, pela primeira vez, a circulação simultânea de PCV2a e PCV2b em queixadas de vida livre na Mata Atlântica paulista. Entre 157 amostras analisadas, 19 (11 %), provenientes de 116 animais, apresentaram resultados positivos, com cargas moderadas ( $\log_{10}$  2,7–3,1 cópias  $\mu\text{L}$ ) predominando em swabs fecais, mas também detectadas em soro e tecidos.

A qPCR multiplex utilizada exibiu limite de detecção de 5 cópias por reação e eficiência próxima de 100 % para ambos os genótipos, o que confirmou a confiabilidade do método na identificação de baixas cargas virais.

Observou-se predomínio do genótipo PCV2b (12/19 amostras); a interface crescente entre suínos domésticos, javalis e queixadas sugeriu possível fluxo viral do ambiente doméstico para o silvestre, sem excluir eventual *spill-back*. Embora não tenham sido registrados sinais clínicos, a presença do vírus em uma espécie chave para a dinâmica florestal indicou risco potencial tanto para o ecossistema quanto para cadeias produtivas adjacentes.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 119–142.
2. Dei Giudici S, Mura L, Bonelli P, et al. Evidence of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genetic Shift from PCV2b to PCV2d Genotype in Sardinia, Italy. *Viruses* 2023; 15: 2157.
3. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982; 295: 64–66.
4. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 1995; 44: 49–64.
5. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 119–142.
6. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology* 2016; 13: 184.
7. Kwon T, Yoo SJ, Park C-K, et al. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Vet Microbiol* 2017; 207: 178–180.
8. Klaumann F, Franzo G, Sohrmann M, et al. Retrospective detection of *Porcine circovirus 3* (PCV-3) in pig serum samples from Spain. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 1290–1296.
9. Zhang H, Hu W, Li J, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 1057–1061.
10. Nguyen V, Do H, Huynh T, et al. Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms. *Transbound Emerg Dis* 2022; 69: 538–548.
11. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol*; 91. Epub ahead of print January 2017. DOI: 10.1128/JVI.01879-16.

12. Zhang H, Hu W, Li J, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 1057–1061.
13. Fanelli A, Pellegrini F, Camero M, et al. Genetic Diversity of Porcine Circovirus Types 2 and 3 in Wild Boar in Italy. *Animals* 2022; 12: 953.
14. Seibert CH, Pinto AR. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012; 43: 857–864.
15. Castro AMMG, Castro FG, Budiño FEL, et al. Detection of Genetic characterization of Porcine circovirus 2 (PCV2) in Brazilian wildlife boars. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 1022–5.
16. Zhai S-L, Lu S-S, Wei W-K, et al. Reservoirs of Porcine Circoviruses: A Mini Review. *Front Vet Sci*; 6. Epub ahead of print 19 September 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00319.
17. Lv Q, Guo K, Zhang Y. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes* 2014; 49: 1–10.
18. Gainor K, Castillo Fortuna Y, Alakkaparambil AS, et al. Detection and Complete Genome Analysis of Porcine Circovirus 2 (PCV2) and an Unclassified CRESS DNA Virus from Diarrheic Pigs in the Dominican Republic: First Evidence for Predominance of PCV2d from the Caribbean Region. *Viruses* 2022; 14: 1799.
19. Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology* 2007; 357: 175–185.
20. Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *J Virol* 1998; 72: 5262–5267.
21. Franzo G, Segalés J. Porcine Circovirus 2 Genotypes, Immunity and Vaccines: Multiple Genotypes but One Single Serotype. *Pathogens* 2020; 9: 1049.
22. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One* 2018; 13: e0208585.

23. Wang Y, Noll L, Lu N, et al. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 1284–1294.
24. Firth C, Charleston MA, Duffy S, et al. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. *J Virol* 2009; 83: 12813–12821.
25. Franzo G, Cortey M, Segalés J, et al. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogenet Evol* 2016; 100: 269–280.
26. Santo ACD, Gressler LT, Costa SZR, et al. Porcine circovirus 2 and 3 in wild boars in Southern Brazil. *Ciência Rural*; 52. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210209.
27. Pitt SJ, Gunn A. The One Health Concept. *Br J Biomed Sci*; 81. Epub ahead of print 15 February 2024. DOI: 10.3389/bjbs.2024.12366.
28. Ullmann LS, Gravinatti ML, Yamatogi RS, et al. PCR and qPCR for detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in captive white-lipped (*Tayassu pecari*) and collared (*Tayassu tajacu*) peccaries from Southern Brazil. *Semin Cienc Agrar* 2016; 37: 4167.
29. Silva MK da, Akash S, Aquino JGF de, et al. A newly discovered circovirus and its potential impact on human health and Disease-editorial. *International Journal of Surgery*. Epub ahead of print 16 February 2024. DOI: 10.1097/JS9.0000000000001198.
30. Zhai S-L, Lu S-S, Wei W-K, et al. Reservoirs of Porcine Circoviruses: A Mini Review. *Front Vet Sci*; 6. Epub ahead of print 19 September 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00319.
31. Opriessnig T, Xiao C, Mueller NJ, et al. Emergence of novel circoviruses in humans and pigs and their possible importance for xenotransplantation and blood transfusions. *Xenotransplantation*; 31. Epub ahead of print 19 March 2024. DOI: 10.1111/xen.12842.
32. Souza AE de, Cruz AC de M, Rodrigues IL, et al. Molecular detection of porcine circovirus (PCV2 and PCV3), torque teno swine virus 1 and 2 (TTSuV1 and

- TTSuVk2), and histopathological findings in swine organs submitted to regular slaughter in Southeast, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 2023; 45: e000623.
33. de Oliveira RC, Fernandes J, Gonçalves-Oliveira J, et al. Out of the shadows, into the spotlight: Invisible zoonotic diseases in Brazil. *The Lancet Regional Health - Americas* 2022; 8: 100202.
  34. Fundação Florestal. Parque Estadual da Ilha do Cardoso . <https://guiadeareasprotegidas.sp.gov.br/ap/parque-estadual-ilha-do-cardoso/>.
  35. Fundação Florestal. Parque Estadual da Santa Virgínia. <https://santavirginia.ingressosparquespaulistas.com.br/>.
  36. Fundação Florestal. Estação Ecológica de Caetetus. <https://caetetus.ingressosparquespaulistas.com.br/>.
  37. Hui A. Guidelines in Designing a Universal Primer Mixture to Probe and Quantify Antibiotic-Resistant Genes Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cureus*. Epub ahead of print 15 September 2024. DOI: 10.7759/cureus.69479.
  38. Masuzawa T, Sakakibara K, Saito M, et al. Characterization of *Leptospira* species isolated from soil collected in Japan. *Microbiol Immunol* 2018; 62: 55–59.
  39. Zhao K, Han F, Zou Y, et al. Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. *Virology* 2010; 7: 374.
  40. Opriessnig T, Karuppanan AK, Halbur PG, et al. Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. *Vaccine* 2020; 38: 1975–1981.
  41. Hsieh C-K, Chien C-Y, Liu C-W, et al. The Evaluation of a Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Intradermal Vaccine Against a PCV2 Field Strain. *Vaccines (Basel)* 2025; 13: 343.
  42. Franzo G, Cortey M, Segalés J, et al. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogenet Evol* 2016; 100: 269–280.
  43. Rose N, Andraud M, Bigault L, et al. A commercial PCV2a-based vaccine significantly reduces PCV2b transmission in experimental conditions. *Vaccine* 2016; 34: 3738–3745.

44. Karuppannan A, Opriessnig T. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses* 2017; 9: 99.
45. Song T, Hao J, Zhang R, et al. First detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in raccoon dogs. *BMC Vet Res* 2019; 15: 107.
46. Pinheiro ALBC, Bulos LHS, Onofre TS, et al. Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on commercial swine farms. *Res Vet Sci* 2013; 94: 764–768.
47. Li J, Yuan X, Zhang C, et al. A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. *Virology* 2010; 7: 158.
48. Li L, Kapoor A, Slikas B, et al. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *J Virol* 2010; 84: 1674–1682.
49. Opriessnig T, Meng X-J, Halbur PG. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19: 591–615.
50. Jacobson M, Aspan A, Königsson MH, et al. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Vet Microbiol* 2004; 102: 189–201.
51. Trillanes-Flores CE, Naranjo EJ, Ramírez-Marcial N, et al. What do we know about the epidemiology of infectious diseases and parasites of free-ranging Neotropical ungulates? Needs and priorities. *Anim Health Res Rev* 2024; 25: e2.
52. Trillanes-Flores CE, Naranjo EJ, Ramírez-Marcial N, et al. What do we know about the epidemiology of infectious diseases and parasites of free-ranging Neotropical ungulates? Needs and priorities. *Anim Health Res Rev* 2024; 25: e2.
53. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 47–51.
54. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One* 2018; 13: e0208585.

55. Franzo G, Tucciarone CM, Legnardi M, et al. An updated phylogeography and population dynamics of porcine circovirus 2 genotypes: are they reaching an equilibrium? *Front Microbiol*; 15. Epub ahead of print 29 October 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1500498.
56. Yu C, Cao M, Wei Y, et al. Comparative infectivity and horizontal transmission ability of the isolates PCV2a, PCV2b, and PCV2d. *Vet Microbiol* 2024; 297: 110214.
57. Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, et al. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol* 2009; 138: 27–33.
58. Patterson AR, Opriessnig T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev* 2010; 11: 217–234.
59. SEGALES J, CALSAMIGLIA M, OLVERA A, et al. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2005; 111: 223–229.
60. Rudova N, Buttler J, Kovalenko G, et al. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. *Viruses* 2022; 14: 924.
61. Caprioli A, McNeilly F, McNair I, et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci* 2006; 81: 287–292.
62. Kleymann A, Soto E, Illanes O, et al. High rates of detection and complete genomic analysis of porcine circovirus 2 (PCV2) in the Lesser Antilles island of St. Kitts: Identification of PCV2b-PCV2d recombinants. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 2282–2289.
63. Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, et al. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Manag* 2017; 3: 7.
64. Nielsen GB, Nielsen JP, Haugegaard J, et al. Comparison of serum pools and oral fluid samples for detection of porcine circovirus type 2 by quantitative real-time PCR in finisher pigs. *Porcine Health Manag* 2018; 4: 2.

65. Rudova N, Buttler J, Kovalenko G, et al. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. *Viruses* 2022; 14: 924.
66. de Sousa Moreira A, Santos-Silva S, Mega J, et al. Epidemiology of Porcine Circovirus Type 2 Circulating in Wild Boars of Portugal during the 2018–2020 Hunting Seasons Suggests the Emergence of Genotype 2d. *Animals* 2022; 12: 451.
67. Rudova N, Buttler J, Kovalenko G, et al. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine. *Viruses* 2022; 14: 924.
68. Franzo G, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *PLoS One* 2018; 13: e0208585.

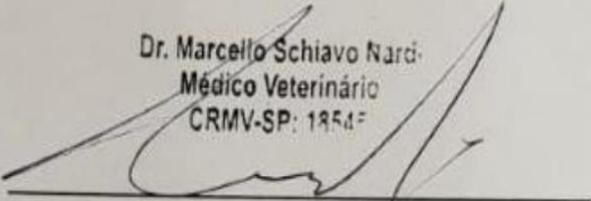
**ANEXOS****Anexo 1. Termo de doação das amostras**

São Paulo, 12 de dezembro de 2022

Como responsável veterinário pelo projeto intitulado "Avaliação genética e sanitária de queixadas (*Tayassu pecari*) em remanescentes de mata atlântica do Estado de SP", auxílio FAPESP N° 2015/20133-0, número SISBIO 51307-5, CEUA UFABC nº 4837100519, declaro que estou cedendo amostras de soro e tecido para diagnóstico molecular de agentes virais potencialmente causadores de doença para a espécie, sob responsabilidade da pesquisadora Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, vinculada ao Programa de Pós Graduação *Scripto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental – Universidade Paulista UNIP.

Sem mais para o momento, estou à disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente

  
Dr. Marcello Schiavo Nardi  
Médico Veterinário  
CRMV-SP: 18547

Marcello Schiavo Nardi  
[marcellosn@gmail.com](mailto:marcellosn@gmail.com)  
11999376454

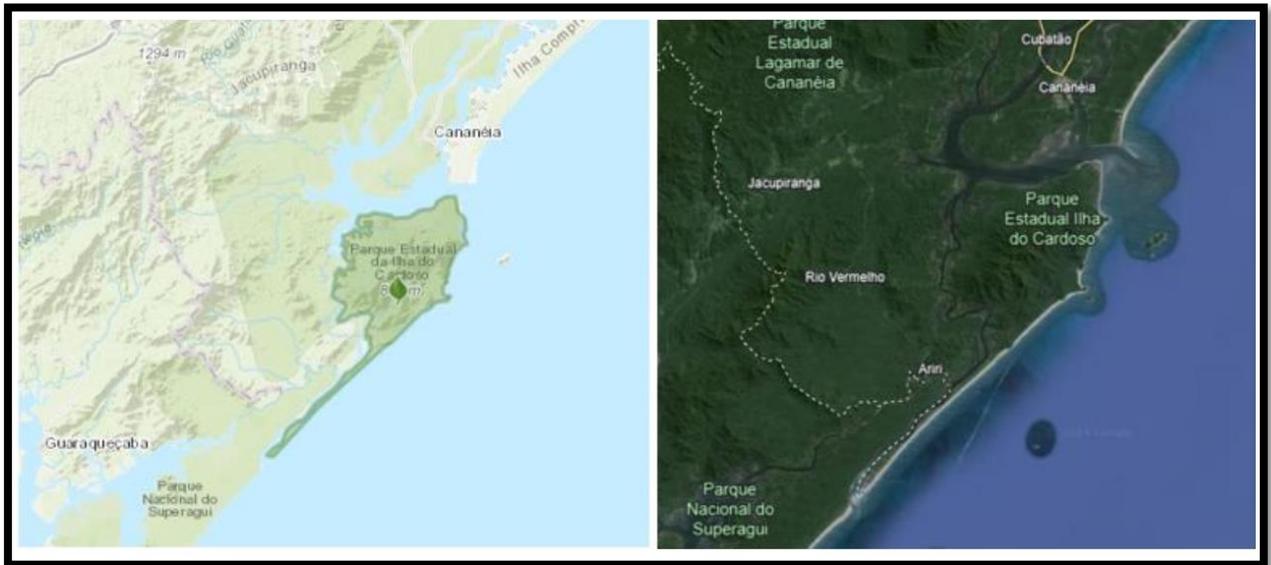
## Anexo 2. Certificado de aprovação pelo CEUA.

 Universidade Federal do ABC	<b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b> <b>Fundação Universidade Federal do ABC</b> <b>Comissão de Ética em Uso de Animais</b>	
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação demográfica, genética e sanitária de populações de queixada (<i>Tayassu pecari</i>) da Mata Atlântica", protocolada sob o CEUA nº 4837100519, sob a responsabilidade de <b>Cibele Biondo e equipe; Anna Carolina Russo Curbelo Martin; Gabriela Schmaedecke; Mozart Sávio Pires Baptista; Alexine Keuroghlian; Marcello Schiavo Nardi</b> - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>aprovada</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC (CEUA/UFABC) na reunião de 16/07/2019.</p>		
<p>We certify that the proposal "Demographic, genetic and sanitary evaluation of white-lipped peccary populations (<i>Tayassu pecari</i>) from the Atlantic Forest", utilizing 90 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 4837100519, under the responsibility of <b>Cibele Biondo and team; Anna Carolina Russo Curbelo Martin; Gabriela Schmaedecke; Mozart Sávio Pires Baptista; Alexine Keuroghlian; Marcello Schiavo Nardi</b> - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was <b>approved</b> by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of ABC (CEUA/UFABC) in the meeting of 07/16/2019.</p>		
Finalidade da Proposta: <a href="#">Pesquisa (Acadêmica)</a>		
Vigência da Proposta: de 07/2019 a 06/2021	Área: <a href="#">Centro de Ciências Naturais E Humanas</a>	
Origem: <a href="#">Não aplicável</a>	sexo: <a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 15 anos</a>
Espécie: <a href="#">Espécies silvestres brasileiras</a>	N: <a href="#">90</a>	Peso: <a href="#">1 a 40 kg</a>
Linhagem: <a href="#">Tayassu pecari</a>		
Registro IBAMA/Sisbio/Etc: <a href="#">SISBIO 51307-5</a>		

### Anexo 3. Certificado de aprovação de coletadas de amostra pelo SISBIO

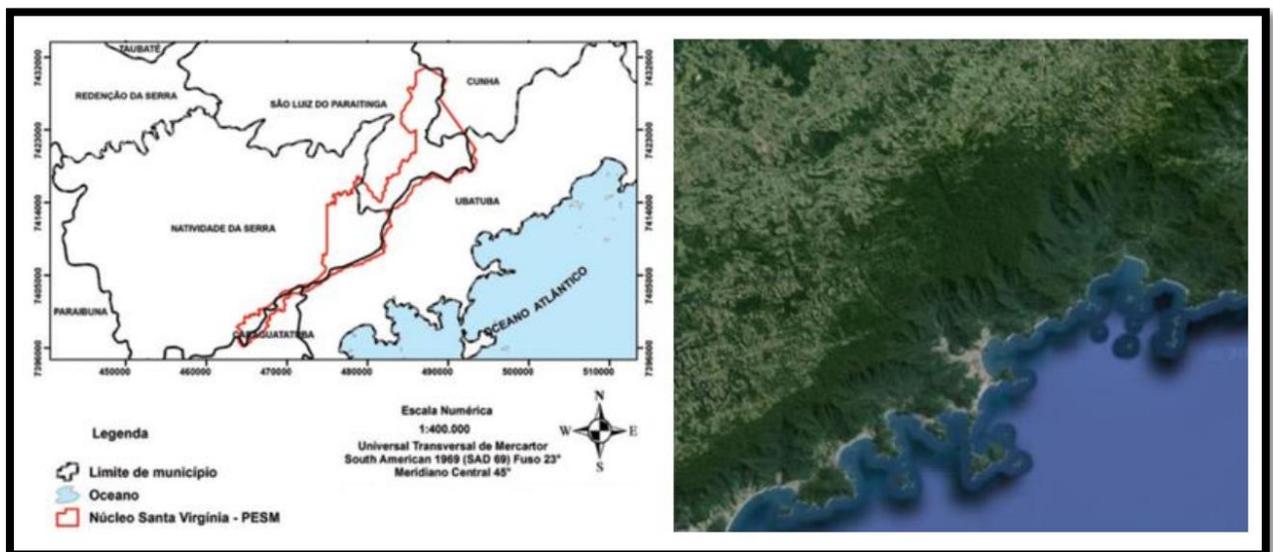
	Ministério do Meio Ambiente - MMA		
	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio		
	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO		
<b>Autorização para atividades com finalidade científica</b>			
Número: 51307-5	Data da Emissão: 25/04/2019 10:22:37	Data da Revalidação*: 25/04/2020	
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.			
<b>Dados do titular</b>			
Nome: MARCELLO SCHIAVO NARDI	CPF: 307.513.278-08		
Nome da Instituição: PMSP - SVMA - Divisão Técnica de Medicina Veteri	CNPJ: 74.118.514/0004-25		
<b>Cronograma de atividades</b>			
#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura e Coleta de Material	10/2017	10/2019

**Anexo 4. Mapa do Parque Estadual da Ilha do Cardoso e área visualizada por satélite.**

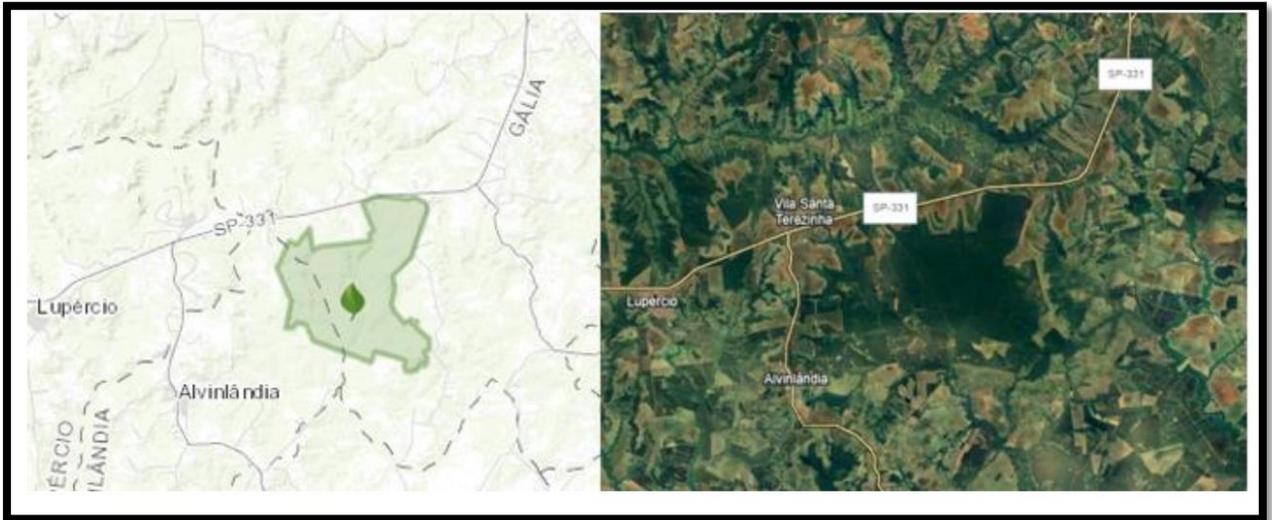


Fonte: Unidade de Conservação do Brasil e Google Earth (Jun/2025).

**Anexo 5. Mapa do Parque Estadual da Serra do Mar Núcleo Santa Virgínia e área visualizada por satélite.**



Fonte: Bussolotti et al., 2013; e Google Earth (Jun/2025)

**Anexo 6. Mapa da Estação Ecológica de Caetetus e área visualizada por satélite**

**Fonte:** Unidade de Conservação do Brasil e Google Earth (Jun/2025)