KAREN LINARES FERRARI

Diversidade molecular do gene *Cap* (ORF-2) do circovírus suíno 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo

São Paulo

2012

KAREN LINARES FERRARI

**Diversidade molecular do gene *Cap* (ORF-2) do circovírus suíno 2 (PCV2)
detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em
suínos abatidos no Estado de São Paulo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2640 FMVZ	<p>Ferrari, Karen Linares</p> <p>Diversidade molecular do gene <i>Cap</i> (ORF-2) do circovirus suíno 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo / Karen Linares Ferrari. -- 2012.</p> <p>118 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.</p> <p>1. PCV2. 2. Diversidade molecular. 3. Lesões pneumônicas. 4. Suínos. I. Título.</p>
----------------	---

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diversidade molecular do gene *cap*(ORF-2) do Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo", protocolado sob o nº 1919/2010, utilizando 200 (duzentos) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Molecular diversity of cap gene (ORF-2) of porcine circovirus type 2 (PCV2) detected in samples of lung with and without macroscopic pneumonic lesions in pigs slaughtered in São Paulo state", protocol number 1919/2010, utilizing 200 (two hundred) pigs, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERRARI, Karen Linares

Título: Diversidade molecular do gene *Cap* (ORF-2) do Circovírus Suíno 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

RESUMO

FERRARI, K. L. **Diversidade molecular do gene *Cap* (ORF-2) do circovírus suíno 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo.** [Molecular diversity of Cap gene (ORF-2) of porcine circovirus 2 (PCV2) detected in samples of lung with and without macroscopic pneumonic lesions in pigs slaughtered in São Paulo State]. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Circovírus suíno 2 (PCV2) associado a doenças (PCVAD do inglês “Porcine circovirus associated disease”) pode se manifestar como infecção sistêmica, enterite, problemas reprodutivos, síndrome de dermatite e nefropatia suína e complexo de doenças respiratórias (PRDC). A ocorrência de PRDC, que afeta, principalmente, animais de crescimento e terminação, caracteriza-se por crescimento lento, tosse prolongada e dispnéia, assim como lesões macroscópicas características em pulmão. PCV2 possui três principais regiões abertas de leitura (ORFs): ORF-1 codifica proteínas envolvidas na replicação (gene Rep); ORF-2 codifica proteína estrutural do capsídeo (gene *Cap*) e ORF-3 codifica proteína envolvida na indução de apoptose celular. O gene *Cap* é a região mais variável do PCV2, havendo indícios da associação entre a proteína Cap e patogenicidade. De acordo com a nomenclatura unificada proposta por Segalés et al., três diferentes genótipos são atualmente reconhecidos (PCV2a, -2b, -2c). O aumento na incidência e gravidade da PCVAD foi atribuído ao surgimento do PCV2b tornando-se o mais prevalente subtipo em países da América do Norte, Europa, e no Brasil. Diante dos prejuízos que a PRDC acarreta, 200 amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas foram analisadas para PCV2 pela PCR; 88,5 % (177/200) foram positivas para PCV2 por PCR corroborando com estudos em que o PCV2 foi encontrado em um grande número de amostras e poderia desenvolver um papel da PRDC. Entretanto, não houve associação significativa entre amostras positivas e presença ou ausência de lesões pneumônicas macroscópicas ($p=0,26$). A análise filogenética de 27 amostras PCV2 positivas sequenciadas (22 genoma completo e cinco ORF-2 completa) foram agrupadas no genótipo PCV2b. Devido à alta identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre as sequências obtidas e as recuperadas de estudos anteriores com presença e ausência de PCVAD, não há indícios de associação entre patogenicidade e o subtipo de PCV2 identificado neste trabalho.

Palavras-chave: PCV2. Diversidade molecular. Lesões pneumônicas. Suínos.

ABSTRACT

FERRARI, K. L. Molecular diversity of Cap gene (ORF-2) of porcine circovirus 2 (PCV2) detected in samples of lung with and without macroscopic pneumonic lesions in pigs slaughtered in São Paulo State [Diversidade molecular do gene Cap (ORF-2) do circovírus suíno 2 (PCV2) detectado em amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas em suínos abatidos no Estado de São Paulo]. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Porcine circovirus 2 (PCV2) associated disease (PCVAD) may manifest as systemic infection, enteritis, reproductive problems, dermatitis and nephropathy syndrome and porcine respiratory disease complex (PRDC). The occurrence of PRDC, which affects mainly the growing and finishing animals, characterized by slow growth, prolonged cough and dyspnea, as well as characteristic gross lesions in the lungs. PCV2 has three main regions denominated open reading frames (ORFs): ORF-1 encodes a protein involved in replication (Rep gene), ORF-2 encodes the capsid structural protein (Cap gene) and ORF-3 encodes a protein involved in the induction of cellular apoptosis. The Cap gene is the most variable region of PCV2, with evidence of association between the Cap protein and pathogenicity. According to an unified nomenclature proposed by Ségales et al., three different subtypes are currently recognized (PCV2a,-2b-2c). The increased incidence and severity of PCVAD was attributed to the rise of PCV2b becoming the most prevalent subtype in countries of North America, Europe, and Brazil. Given the damage that leads to PRDC, 200 samples of lungs with and without macroscopic pneumonic lesions were analyzed for PCV2 by PCR; 88.5% (177/200) were positive for PCV2 by PCR corroborating with studies in which PCV2 was found in a large number of samples and could develop a role in PRDC. However, there was no significant association between positive samples and the presence or absence of macroscopic pneumonic lesions ($p=0.26$). Phylogenetic analysis of the 27 samples PCV2 positive sequenced (22 complete genome and five complete ORF-2) were grouped in genotype PCV2b. Due to the high identity between the nucleotide and amino acid sequences obtained and retrieved from previous studies with presence and absence of PCVAD, there is no evidence of association between subtype and pathogenicity of PCV2 identified in this work.

Keywords: PCV2. Molecular diversity. Pneumonic lesions. Pigs.

Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meus pensamentos e acalmar minha ansiedade.

Aos meus pais Marilande L. Pádua e Humberto A. Ferrari pelo amor, incentivo e por me ensinar que conhecimento é a única coisa que realmente levamos conosco.

Ao meu “segundo pai” Álvaro J. P. Braga por sempre mostrar o que há adiante.

Ao meu marido Rafael L. Marins pelo companheirismo, compreensão, amor e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Richzenhain por me fazer acreditar que seria capaz e me ensinar a sempre buscar respostas.

Em especial a Dr. Alessandra M. M. G. Castro pela amizade e apoio incondicional durante minha vida acadêmica. Ela me ensinou que as oportunidades nunca devem ser negadas.

À técnica do Laboratório Sheila Oliveira pela amizade e apoio técnico durante a elaboração prática da dissertação.

À pós-graduanda Cintia M. Favero pela amizade e ajuda durante a elaboração dos resumos dos congressos.

À pós-graduanda Paloma D. O. Tonietti pela amizade, paciência e incentivo durante a conclusão da dissertação.

Às pós-graduandas e amigas LABMAS: Carolina T. Alejo, Haila C. Peixoto, Andrea Estevez, Cintia M. B. Baldin e Fernanda D. F. Silva por mostraram que as coisas nem sempre são fáceis, mas podem ser muito gratificantes.

Aos meus amigos Vinícius Izidio e Michell Arcari pelo apoio durante as “horas de computador”.

À secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio durante esse período.

Às granjas e os abatedouros que forneceram material necessário para desenvolvimento da dissertação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa concedida e o apoio financeiro para a realização deste trabalho (processo nº 2010/03371-1).

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	O mapa linear do genoma do PCV1 e 2. mostrando as 2 ORFs, <i>Cap</i> e <i>Rep</i> ; as três <i>motifs</i> conservadas nas enzimas do RCR (rolling circle replication) I, II e III; alça P (<i>P-loop</i>) para ligação com o sítio de dNTP inserido no gene <i>rep</i> está indicado pela seta. A ORF-3 está indicada pela caixa cinza escura. As repetições de hexameros (1-3) estão marcadas em caixas cinza claro	26
Figura 2 -	Distância do <i>p</i> /Histograma de frequência mostrando a frequência de distribuição pareada de distância entre 196 sequencias da região aberta de leitura 2 (ORF-2) do PCV2. O ponto de corte está localizado entre os dois picos equidistantes.....	27
Figura 3 -	Ciclo de vida do PCV2	29
Figura 4 -	Origem das amostras de pulmão com e sem lesão pneumônica dentro do Estado de São Paulo.....	42
Figura 5 -	Representação da região de ligação do fragmento de 476 pb no vetor plasmidial pTZ57R/T.....	47
Figura 6-	Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb. Amostras 36, 38, 42, 66, 113, 137, 138, 140, 141, 142, 159, 160 e 161 foram amplificadas para controle endógeno (850 pb).	49
Figura 7- .	Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb. Amostras 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157 e 158 foram amplificadas com <i>primers</i> Fa/Ra (476 pb); Controle negativo: N1 e N2.....	50
Figura 8 -	Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb.....	55
Figura 9 -	Distribuição das amostras positivas e negativas para PCV2 em pulmão com presença ou ausência de lesões pneumônicas macroscópicas.....	56
Figura 10 -	Distribuição das amostras positivas para PCV2, oriundas de Holambra, Óleo, Espírito Santo do Pinhal, Itú e Fartura	57
Figura 11 -	Alinhamento dos aminoácidos da região ORF-2 das 27 amostras de PCV2 isoladas. Os códons 20, 63 e 190 apresentando substituições dos aminoácidos estão representadas pelos círculos	62
Figura 12-	Árvore filogenética i: análise das 22 sequências de PCV2 com genoma completo e sequencias obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). Os quadrados em cinza representam a localização das 22 sequências na árvore. A	

árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas). 65

Figura 13 - Árvore filogenética ii: análise da região ORF-2 das 22 e sequências obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). Os quadrados em cinza representam a localização das 22 sequências na árvore. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas). 65

Figura 14 - Árvore filogenética iii: ORF-2 das 27 sequências de PCV2 e sequências obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). Os quadrados em cinza representam a localização das 22 sequências na árvore. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas). 67

LISTAS DE QUADROS

Quadro1-	Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de <i>primers</i> Fa2/Ra2 utilizados para detecção do PCV2	44
Quadro 2-	Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de <i>primers</i> AC1/AC2 utilizados para detecção do gene β -actina.	48
Quadro 3-	Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de <i>primers</i> P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8 utilizados para sequenciamento total do PCV2.....	51
Quadro 4-	Condições utilizadas para amplificar diferentes fragmentos do PCV2. Detecção do produto amplificado pela PCR.....	51
Quadro 5-	Detalhamento das 27 amostras positivas para PCR submetidas ao sequenciamento, seguindo: Identificação, lesão em pulmão, granja de origem e comprimentos dos fragmentos sequenciados.....	58
Quadro 6 -	Códons e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-2 de PCV2 das amostras em estudo.	63

APÊNDICE

APÊNDICE A-	Quadro das amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas analisadas.	98
APÊNDICE B -	Tabelas de sequencias obtidas pelo GenBank com: numero de acesso, genótipo, ano, status de saúde, autor das sequencias, autor do trabalho	102
APÊNDICE C -	Pares de <i>primers</i> P1/P2; P3/P4; P5/P6; P7/P8 utilizados no seqüenciamento do PCV2. A localização, seqüência e posição dos <i>primers</i> tem como referência uma amostra do GenBank (numero de acesso AF201897).	107
APÊNDICE D -	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da ORF-1 das 22 amostras com genoma completo de PCV2. Os pontos indicam resíduos idênticos	108
APÊNDICE E -	Matriz de identidade e de nuncleotídeos da ORF-1 das 22 sequencias genoma completo.	114
APÊNDICE F -	Matriz de identidade e de aminoácidos da ORF-1 das 22 sequencias genoma completo.	115
APÊNDICE G -	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ORF-2 das 27 amostras de PCV2 seqüenciadas. Os pontos indicam resíduos idênticos.....	116
APÊNDICE H -	Matriz de identidade e de nuncleotídeos da ORF-2 das 27 sequencias.....	121
APÊNDICE I -	Matriz de identidade de aminoácidos da ORF-2 das 27 sequencias (22 sequencias com genoma completo e 5 sequencias com ORF-2 completa)	122

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

®	Marca registrada
%	porcento
µg	micrograma
µL	microlitro
°C	graus Celsius
A	Alanina
AA	aminoácido
BFDV	Vírus da doença dos bicos e penas
CaCV	Circovírus dos canários
Cap	Proteína estrutural
CAP3	<i>Contig Assembly Program</i>
CAV	Vírus da anemia das galinhas
CoCV	Circovírus dos columbídeos
CoGV	Circovírus dos gansos
CsCl	Cloreto de Césio
CT	Tremor Congênito
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
et al.	e colaboradores
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	Glicina
G	gramas
HCl	Ácido Clorídrico
I	Isoleucina
IFI	Imunofluorescência indireta
IHS	Imunoistoquímica
IP	Imunoperoxidase

ISH	Hibridização <i>in situ</i>
K	Lisina
Kb	quilobases
kDa	quilodalton
Kg	quilo
L	Leucina
M	molar
Mega	<i>Molecular Evolucionary Genetics Analysis</i>
MG	Minas Gerais
Mg ²⁺	magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min.	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
Mn ²⁺	manganês
mrtqPCR	<i>Multiplex</i> PCR quantitativa
Ng	nanograma
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
nm	nanômetro
npPCV	não patogênico PCV
nt	nucleotídeos
ORF	Região aberta de leitura
P	Prolina
PASC	<i>Methodology based on pairwise sequence comparisons</i>
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV1	Circovírus suíno 1
PCV2	Circovírus suíno 2
PCVD	Doenças do circovírus suíno
PCVAD	Doenças associadas ao circovírus suíno
PDNS	Síndrome de dermatite e nefropatia suína
pH	concentração de hidrogênio iônico

PiCV	Circovírus dos pombos
PK-15	células de rim de suíno - 15
pmol	picomol
PMWS	Síndrome de refugagem multissistêmica pós desmame
PNP	Pneumonia proliferativa necrosante
PPV	Parvovírus suíno
PRCD	Coronavírus respiratório suíno
PRDC	Doença do complexo respiratório suíno
PRRSV	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva
R	Arginina
Rep	Proteína replicativa
RCR	<i>Rolling circle replication</i>
RFLP-PCR	Polimorfismo de fragmento de restrição do produto de PCR
RNA	ácido ribonucléico
S	Svedberg coeficiente de sedimentação
s	segundos
<i>sp</i>	Espécie
SIV	Vírus influenza suína
SP	São Paulo
T	Treonina
TE	Tampão TRIS-EDTA
TTSuV1	Torque teno sus virus 1
TTSuV2	Torque teno sus virus 2
TRIS	hidroximetil-aminometano
U	unidades
USP	Universidade de São Paulo
V/cm	Volt/centímetro
x	vezes
X ²	Quiquadrado
x g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	ETIOLOGIA	22
1.2	INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO E REPLICAÇÃO VIRAL.....	28
1.3	DOENÇAS ASSOCIADAS AO PCV (PCVAD)	29
1.4	INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR PCV2	30
1.5	PCV2 ASSOCIADO À INFECÇÃO SISTÊMICA	31
1.6	PCV2 ASSOCIADO À FALHA REPRODUTIVA.....	32
1.7	PCV2 ASSOCIADO À SÍNDROME DE DERMATITE E NEFROPATIA SUÍNA ...	33
1.8	PCV2 ASSOCIADO AO COMPLEXO DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS (PRDC)	34
1.9	PCV2 ASSOCIADO À ENTERITE	36
1.10	EPIDEMIOLOGIA.....	36
1.11	DIAGNÓSTICO	37
1.12	CONTROLE	39
2	OBJETIVO	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	COLETA E MACERAÇÃO.....	42
3.2	EXTRAÇÃO DO DNA	43
3.3	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	44
3.3.1	Oligonucleotídeos iniciadores	44
3.3.2	Determinação da sensibilidade analítica dos primers Fa2/Ra2.	45
3.3.3	Detecção, purificação e quantificação do produto amplificado pela PCR	45
3.3.4	Inserção no plasmídeo, transformação bacteriana e extração plasmidial.....	45
3.3.5	Controle endógeno.....	48

3.3.6	Detecção do produto amplificado pela PCR.....	49
3.4	SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA PCR.....	50
3.4.1	PCR.....	50
3.4.2	Reação de Sequenciamento	52
3.5	ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE PCV2 DETECTADO ATRAVÉS DA PCR E LESÕES EM PULMÃO.....	53
3.6	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS	53
3.6.1	Montagem das sequências consensos	53
3.6.2	Alinhamento das sequências.....	54
3.6.3	Diagrama de identidade e similaridade de nucleotídeos e aminoácidos	54
3.6.4	Construção na árvore genealógica.....	54
4	RESULTADOS	55
4.1	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA.	55
4.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE PCV2 DETECTADO ATRAVÉS DA PCR E LESÕES EM PULMÃO.....	56
4.3	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DE PCV2.....	58
4.4	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE PCV2	59
4.4.1	Análise da ORF-1 das sequencias completas de PCV2.....	59
4.4.2	Análise da ORF-2 das sequencias completas de PCV2.....	60
4.5	ANALISE DA ORF-2 DAS SEQUENCIAS COMPLETAS E PARCIAIS DE PCV2	61
4.6	GENOTIPAGEM DAS SEQUÊNCIAS DO PCV2	64
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE.....	97

1 INTRODUÇÃO

Com os avanços técnicos e científicos, a produção animal foi se intensificando cada vez mais e o setor produtivo preocupando-se em aumentar a quantidade de alimentos e oferecê-los a população com menor preço (PAIXÃO, 2005).

A carne suína é a mais produzida e consumida no mundo. Durante o período entre 2008 e 2011, a produção mundial de carne suína apresentou um crescimento de 11%, onde os Estados Unidos e o Brasil correspondem ao terceiro e quarto maiores produtores, respectivamente (SILVEIRA; TALAMINI, 2007; ABIPECS, 2011).

O setor de produção qualifica a carne suína como um dos responsáveis pelo desenvolvimento econômico e social de muitos municípios brasileiros, gerando 600 mil empregos no campo, indústria, comércio e serviços (ABIPECS, 2011).

O aumento da produção da carne suína de 3,026 mil toneladas para 3,362 mil toneladas do ano de 2008 para 2011, indicou que a competitividade brasileira no mercado externo esteve comprometida, de um lado, pela valorização do real, de outro, pela mudança dos procedimentos de alguns mercados (ABIPECS, 2011).

Desta forma, o fortalecimento do mercado interno tornou as vendas domésticas mais atrativas do que exportar e o consumo per capita passou de 13,4 Kg para 15,1 Kg (ABIPECS, 2011).

Entretanto, a intensificação na produção amplia o risco do surgimento das enfermidades respiratórias.

O complexo das doenças respiratórias em suínos (PRDC) está difundido na maioria das criações brasileiras e possuem grande destaque entre as patologias suínas. Os prejuízos afetam tanto os produtores com perdas de animais por morte, gastos com medicamentos, vacinas e diminuição de ganho de peso diário, como as indústrias pelas perdas consideráveis no abate (SOBESTIANSKY et al., 1987; KICH; PONTES, 2001; BARCELLOS et al., 2008).

Os fatores determinantes das doenças respiratórias suínas que acarretam tais prejuízos são, geralmente, infecciosos, causados por agentes bacterianos e/ou virais. Dentre eles destacam-se vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), vírus da influenza suína (SIV), coronavírus respiratório suíno (PRCD) e circovírus suíno 2 (PCV2) (BARCELLOS et al., 2008) e, recentemente, o *Torque teno sus vírus 1* (TTSuV1) (KEKARAINEN, et al., 2006; ELLIS et al., 2008).

Circovírus suíno (*Porcine circovirus* - PCV) foi primeiramente relatado por Tischer et al. (1974), sendo este descrito como um vírus morfológicamente semelhante a um picornavírus, causando infecções persistentes em células PK-15 (rim suíno) sem induzir efeito citopático. Posteriormente, demonstraram que o vírus era constituído por DNA de fita simples, circular, razão pela qual o denominaram de Circovírus suíno (TISCHER et al., 1982), e considerado não patogênico após a inoculação de isolados de PCV1 em suínos que não desenvolverem doença (TISCHER et al., 1986).

Em 1991 no Canadá, uma síndrome emergente, denominada síndrome de refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS - *Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*) (CLARKE et al., 1997) e, posteriormente, inclusa dentro do termo PCVAD (*Porcine Circovirus Associated Disease*), foi a primeira doença a ser associada a um nova estirpe de PCV denominada PCV2 (ALLAN et al., 1998; OPRIESSNIG et al., 2007). Desde então, a presença do vírus foi relatada em países como Estados Unidos e França e Espanha (DAFT et al., 1996; LECANN et al., 1997; SEGALÉS et al., 1997)

No Brasil, a primeira descrição da doença foi realizada em 2000, causando grandes perdas econômicas e mortes de suínos na fase de crescimento-terminação. Entretanto, trabalho realizado por Ciacci-Zanella et al. (2006), reportou a infecção por PCV2 em materiais arquivados desde 1988 (CIACCI-ZANELLA; MORES, 2003; CIACCI-ZANELLA et al., 2006).

Circovírus suíno 2 (PCV2), genotipicamente e fenotipicamente distinto do PCV1 (ALLAN e ELLIS, 2000; FRANÇA et al., 2005), é associado a doenças que se manifestam como infecção sistêmica, doença do complexo respiratório, enterite, síndrome de dermatite e nefropatia suína e distúrbios reprodutivos, recebendo a terminologia descrita como doenças associadas ao PCV2 (PCV2 *associated disease*- PCVAD) (OPRIESSNIG et al., 2007).

Em setembro de 2008, no Canadá, amostras de pulmão e linfonodos de suínos apresentando a síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRS), foram submetidos a técnica de multiplex PCR quantitativa em tempo real (*multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction diagnostic assay* – mrtqPCR), para diferenciar PCV2a e b, e posteriormente foram sequenciadas. Os resultados demonstraram a presença de um novo PCV, denominado PCV1/2a ou PCV3 (GAGNON et al., 2010). Entretanto, não há estudos associados a este novo PCV.

O PCV2 está presente nos casos de PRDC (HARMS et al., 2001; KIM et al., 2003a) sendo conhecido como um patógeno endêmico nas criações de suínos no mundo (ALLAN; ELLIS, 2000).

O PCV2 associado à PRDC foi considerado responsável por uma série de problemas respiratórios, sendo agravado pela interação ou sinergismo com outros patógenos respiratórios, havendo aumento significativo na mortalidade por uma ou múltiplas infecções bacterianas simultâneas (CHAE, 2005).

Em estudo realizado por Kim et al. (2003a), com 105 suínos de idade entre 10 e 18 semanas apresentando PRDC, 85 animais foram positivos para PCV2 através da técnica de hibridização *in situ*, indicando que o PCV2 é amplamente prevalente em suínos com PRDC e deve ser considerado um importante patógeno respiratório.

Szeredi e Szentirmai (2008) relataram grande quantidade de antígenos de PCV2 em linfonodos mediastínicos e pulmão de três animais com 80 dias. Pneumonia proliferativa necrozante (PNP) foi diagnosticada em dois desses animais com pneumonia intersticial e as alterações patológicas macroscópicas encontradas mostraram pulmões não colapsados, firmes e edema interlobular.

Em outro estudo realizado por Grau-Roma e Segalés (2007) sobre o potencial de agentes infecciosos envolvidos na ocorrência de 74 casos de PNP em suínos pós-desmame, mostrou que o PCV2 foi o agente detectado, através da PCR, com maior frequência (85,1 %) em tecidos de pulmão afetados, especulando que o vírus é provavelmente o agente etiológico mais importante nos casos de PNP na Europa.

Sanches et al. (2006a,b) detectaram o antígeno de PCV2 através da imunohistoquímica também em pulmões sem lesão de pneumonia, obtidos de dois abatedouros localizados no Rio Grande do Sul e Mato Grosso. Os autores concluíram que os animais positivos para PCV2, porém sem lesão, poderiam estar no estágio inicial da infecção, sugerindo que a extensão da lesão não estaria relacionada com a presença do agente.

O PCV2 está onipresente na população suína global e, portanto, isto faz a interpretação de testes diagnósticos importante para confirmação de PCVAD pela demonstração de lesões características associadas com os antígenos de PCV2 ou ácido nucleico nos respectivos órgãos (ALLAN; ELLIS, 2000).

Embora possa não ser claro se PCV2 é um patógeno primário, patógeno sinérgico, patógeno secundário ou oportunista, demonstração de lesões pulmonares associadas com DNA de PCV2, certamente, sugerem que o vírus tem um papel importante na PRDC (KIM et al., 2003a; GILLESPIE et al. 2009).

Em 2008, uma nova proposta de nomenclatura padrão definiu três diferentes genótipos filogenéticos para PCV2 (PCV2a, -2b, -2c) (SEGALÉS et al., 2008).

Dados epidemiológicos que existem ainda não comprovaram as variações entre os tipos de PCV2 associados à virulência, uma vez que isolados de animais doentes e sadios tem sido identificados em ambos os grupos (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; JEMERŠIĆ et al., 2004; CASTRO et al., 2007a; OLVERA et al., 2007; BARCELLOS et al., 2009). Ciacci-Zanella et al. (2009) e Castro et al. (2007) demonstraram a presença desses dois grupos circulantes no Brasil.

Um grande número de publicações relatando aumento na incidência e gravidade da PCVAD foi atribuído ao surgimento do PCV2b tornando-o mais prevalente subtipo em surtos na América do Norte, Europa e, recentemente, na Hungria em estudo realizado para identificar o subtipo envolvido na pneumonia suína (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008; TIMMUSK et al., 2008 ; CORTEY et al., 2010; SZEREDI et al., 2011).

No entanto, como as mudanças concentram-se, principalmente, no gene *Cap*, há indícios da associação entre a proteína *Cap* e patogenicidade, uma vez que mutações nessa

região modificam tropismo celular e interações vírus-hospedeiro (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; JEMERŠIĆ et al., 2004; OLVERA et al., 2007; BARCELLOS et al., 2009).

A variabilidade genética de amostras virais e a forma com que as mesmas comportam-se entre si permitem o entendimento dos aspectos evolutivos das linhagens e uma vez que o capsídeo está relacionado ao desenvolvimento de imunidade, o uso dessas informações torna-se fundamental para desenvolvimento de futuras vacinas (FENAUX et al., 2004).

Diante do grande impacto da PRDC na produtividade de suínos, dados que permitem uma melhor compreensão quanto aos agentes envolvidos são de grande importância, pois contribuem para determinar medidas de controle. A frequência de PCV2 em pulmões com lesões de pneumonia irá contribuir para associar esse agente a PRDC. Além disso, o sequenciamento permitirá associar o genótipo de PCV2 envolvido.

1.1 ETIOLOGIA

O Circovírus Suíno (PCV – *Porcine Circovirus*) pertence ao gênero *Circovirus* que compreende as espécies Vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (BFDV), Circovírus de canários (CaCV), Circovírus de gansos (CoGV) e Circovirus de pombos (PiCV). Juntamente com gênero *Gyrovirus*, na qual se encontra o Vírus da anemia das galinhas (CAV), constitui a família *Circoviridae* (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

O Circovirus Suíno divide-se em dois tipos, sendo o Circovírus suíno 1 (PCV1) não patogênico e associado a infecções permanentes em células PK-15 (rim suíno) e Circovírus suíno 2 (PCV2), genotipicamente e fenotipicamente distinto do PCV1 (ALLAN; ELLIS, 2000; FRANÇA et al., 2005), associado a doenças que se manifestam como infecção sistêmica, doença do complexo respiratório, enterite, síndrome de dermatite e nefropatia suína e distúrbios reprodutivos, recebendo a terminologia PCVAD (PCV2 - *associated disease*) (OPRIESSNIG et al., 2007).

Os PCVs são vírus não envelopado, de simetria icosaédrica e medindo entre 15 e 17 nm de diâmetro. O genoma apresenta uma molécula de DNA de fita simples, ambisenso e estrutura circular fechada por ligação covalente e formada por 1,8 kb (TISCHER et al., 1982; CHEUNG, 2003; MANKERTZ et al., 2004).

Considerados um dos menores vírus animal existentes, possuem um genoma total de 1759 nucleotídeos (nt) para o PCV1 e 1767-1768 nt para o PCV2 (HAMEL et al., 1998).

O PCV1 apresenta densidade de flutuação em CsCl (gradiente de centrifugação) de 1,33-1,34g/mL e coeficiente de sedimentação de 57S. As partículas virais intactas não possuem propriedade hemaglutinante, e não podem ser inativadas após expostas a pH 3, clorofórmio e temperaturas de 56°C e 70°C (TISCHER et al., 1982; ALLAN et al., 1994; MANKERTZ et al., 1997; ALLAN; ELLIS, 2000).

O PCV codifica três principais regiões abertas de leitura (*Open reading frames – ORF*) denominadas: ORF-1, gene Rep que codifica as principais proteínas envolvidas na replicação, a Rep e Rep'; a ORF-2, gene Cap que codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo e ORF-3 que codifica proteína não essencial à replicação viral, mas com potencial atividade apoptótica (TISCHER et al., 1982; ELLIS et al., 1998; CHEUNG, 2003; LIU et al., 2006;. KARUPPANNAN et al., 2009).

Outras 10 ORFs foram mapeadas no genoma do PCV2, entretanto, apenas ORF3, em estudos recentes, foi provado ser traduzida em proteína e, assim como inicialmente o gene Cap, pode estar associado à patogenicidade viral (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; 2004; JEMERŠIĆ et al., 2004; OLVERA et al., 2007; LIU et al., 2007; KARUPPANNAN et al., 2009).

O gene Rep localiza-se no sentido positivo/horário (5'-3') da fita viral e codifica a Rep e Rep'. Dois transcritos co-lineares são sintetizados pelo gene rep: (i) o primeiro compreende totalmente a ORF-1 com 945 nt que codifica a proteína Rep com 315 amino ácidos (aa) e (ii) o segundo transcrito sofre um *splicing*, resultando na Rep' com 168 aa (CHEUNG, 2003).

A Rep e Rep' possuem *motifs* 1, 2 e 3 (domínios de enzimas iniciadoras) em seu N-terminal, uma alça P (*steam-loop ou P-loop*) formada por uma região palindrômica com um

octanucleotídeo (AGT ATT AC), para ligação com o sítio de dNTP, e quatro repetições de hexâmero (CGG CAG) onde a replicação viral círculo rolante (*rolling circle*) se inicia (GUTIERREZ et al., 1999; FENIX et al., 2001 CHEUNG, 2004; MANKERTZ et al., 2004).

A função do *motif* 1, ainda não está bem esclarecida. O *motif* 2 está envolvido na coordenação dos cátions divalentes Mg^{2+} . O *motif* 3 é necessário para iniciar a atividade de replicação através do resíduo invariável de tirosina. Esses três *motifs* são necessários para iniciar a replicação da fita de DNA positiva *in vivo*. Os domínios do sítio de ligação dNTP, contribuem com a atividade da ATPase. Mutações nessas regiões comprometem a atividade intrínseca da ATPase, influenciando negativamente na atividade da Rep na replicação viral (GUTIERREZ et al., 1999).

O gene *cap* localiza-se na fita de sentido negativo/anti-horário (3'-5') e é formado por duas regiões: (i) região promotora localizada na ORF-1 de 108 nucleotídeos e (ii) região codificadora formada pela ORF-2. A transcrição desse gene dá origem a um pré-RNAm, também denominado transcrito imediato (*CR*), que sofre *splicing* (remoção do *intron*) gerando um RNAm (maduro) com uma fase aberta de leitura contínua (CHEUNG, 2003).

A ORF-2, localizada no gene *Cap*, tem 699 nucleotídeos (nt) e codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo (*Cap*) de 30 kDa, composta por 233 aa. A síntese dessa proteína ocorre após a infecção da célula pelo agente através de enzimas codificadas pelo hospedeiro (CHEUNG, 2003; MANKERTZ et al., 2004).

A análise das sequências de nucleotídeos do genoma total do PCV2 revelou uma identidade de aproximadamente 95 % entre os isolados. Quando o PCV2 foi comparado ao PCV1, o genoma total apresentou identidade nucleotídica entre 68 e 76 %. Comparando as ORFs-1 e 2, a identidade nucleotídica entre PCV1 e 2 foi de 83 e 67 % e a de aminoácidos de 86 e 63 %, respectivamente (ALAN; ELLIS, 2000).

Em trabalho realizado por Mahé et al. (2000), a análise das regiões imunodominantes determinadas utilizando peptídeos sintéticos da ORF-2, levaram a identificação de três domínios antigênicos principais localizados apenas na proteína *Cap* do PCV2, entre os aminoácidos 65 - 87, 113 - 139 e 193 - 207.

Larochelle et al. (2002) identificaram três grandes regiões de heterogeneidade nos aminoácidos (59 – 80, 121 – 136 e 180 – 191) da região ORF-2, entre 34 PCV2 isolados provenientes de animais do Canadá com histórico clínico de PCVAD. Duas destas regiões corresponderam a dois dos domínios antigênicos descritos por Mahé et al. (2000). Essas áreas imunodominantes da proteína *Cap* exposta à pressão imune seletiva, poderia representar uma região potencial envolvida na emergência de variantes de PCV2.

Três regiões diferentes com grande heterogeneidade, também, foram observadas por Grau-Roma et al. (2008) nas posições dos aminoácidos 57-91, 121-136 e 185-191 e o alinhamento revelou a existência de padrões específicos para cada genótipo de PCV2. No trabalho, o PCV2a apresentou as mesmas substituições em 11 posições e oito delas apresentaram-se dentro da primeira região de heterogeneidade (57-91). Entretanto, no PCV2b, essas áreas apresentaram-se altamente conservadas.

Em adição, AN et al. (2007) propôs a diferenciação entre os grupos 1 e 2 (atualmente denominados PCV2b e –a) em posições específicas nas sequências dos nucleotídeos (262-267nt) e aminoácidos (88-89aa) da região ORF-2. O grupo 1 apresenta as sequências nucleotídicas CCCCCG ou CCCCTC, codificando para prolina e arginina (PR) ou prolina e leucina (PL), e o grupo 2 apresenta a sequência nucleotídica AAAATC codificando para lisina e isoleucina (KI).

Figura 1 - O mapa linear do genoma do PCV1 e 2 mostrando as 2 ORFs, *Cap* e *Rep*; as três *motifs* conservadas nas enzimas do RCR (rolling circle replication) I, II e III; alça P (P-loop) para ligação com o sítio de dNTP inserido no gene *rep* está indicado pela seta. A ORF-3 está indicada pela caixa cinza escura. As repetições de hexâmeros (1-3) estão marcadas em caixas cinza claro

Fonte: adaptado FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2009.

Em 2008, membros do consorcio EU de doenças do circovírus, junto a 15 laboratórios da Europa e América propuseram uma nomenclatura padrão para definir os genótipos do PCV2. Esta proposta foi baseada na metodologia de sequências pareada (*methodology based on pairwise sequence comparisons* - PASC) (GAGNON et al., 2007; GRAU-ROMA et al., 2008; SEGALÉS, et al., 2008; CORTEY et al., 2010).

A metodologia foi baseada na proporção de nucleotídeos diferentes quando duas sequencias eram comparadas (distância do *p*). Subsequentemente, a construção da distância do *p*/histograma de frequência permitiu a determinação de um valor de corte (*threshold*) para distinguir os genótipos (SEGALÉS, et al. 2008).

Desta forma, inicialmente dois genótipos (PCV2a, -b) foram identificados com base nas sequências nucleotídicas do capsídeo (ORF-2) e a definição da distância dos genótipos com limiar de 0,035 (Figura 2), sendo o grupo b associado ao aumento da ocorrência de surtos

de PCVAD em granjas (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008; GRAU-ROMA et al., 2008; SÉGALES et al., 2008; TIMMUSK et al., 2008 ; CORTEY et al., 2010), mas há controvérsias uma vez que o genótipo b têm sido encontrados em suínos saudáveis e doentes de rebanhos afetados e não afetados pela PCVAD (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; LAROCHELLE et al., 2002; GRIERSON et al., 2004; JEMERŠIĆ et al., 2004; BOISSESON et al., 2004; CASTRO et al., 2007).

Figura 2 - Distância do *p*/Histograma de frequência mostrando a frequência de distribuição pareada de distância entre 196 sequências da região aberta de leitura 2 (ORF-2) do PCV2. O ponto de corte está localizado entre os dois picos equidistantes

Fonte: SEGALÉS et al., 2008.

De acordo com Segalés et al. (2008), esses genótipos de PCV2 já eram conhecidos, demonstrados pela maneira que se encaixavam nos principais ramos das árvores filogenéticas derivadas de diferentes métodos. Desta forma, o genótipo PCV2b e –a correspondem ao grupo ‘1’ e ‘2’ (GRAU-ROMA et al., 2008), ‘1’ subdividido em três grupos (1A - 1C) e ‘2’ subdividido em cinco grupos (2A - 2E) (OLVERA et al., 2007), ‘I’ e ‘II’ (BOISSÉSON et al., 2004), ‘SG3’ e ‘SG1/SG2’ (TIMMUSK et al., 2008), ‘A’ e ‘B’ (CASTRO et al., 2007) e fragmentos polimórficos de restrição ‘321’ e ‘422’ (CARMAN et al., 2008).

Posteriormente um terceiro grupo denominado PCV2c foi identificado em amostras arquivadas da Dinamarca onde não havia ou não foi detectado sinais da doença sistêmica (DUPONT et al., 2008).

O PASC pode ser utilizado tanto no genoma total como parcial e desde que as árvores filogenéticas baseadas na ORF-2 são similares as baseadas no genoma total do PCV2 (OLVERA et al., 2007), Segalés et al. (2008) propõem apenas o sequenciamento da ORF-2 para genotipagem do vírus.

1.2 INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO E REPLICAÇÃO VIRAL

Os mecanismos de reconhecimento, ligação e entrada na célula ainda não são completamente compreendidos. Acredita-se que o PCV2 utiliza um receptor celular relativamente comum, pois replicação viral e antígenos do vírus foram encontrados em vários tipos diferentes de células (DARWICH et al., 2004; GILLESPIE et al., 2009).

Sabemos, no entanto, que o PCV2 utiliza sulfato de heparina e sulfato de condroitina B, (MISINZO et al., 2006) como receptores de fixação. Após a infecção, o genoma ssDNA (*single-stranded DNA*) é transportado para o núcleo da célula e convertido por enzimas hospedeiras num dsDNA (*double-stranded DNA*) intermédio. Os RNAs mensageiros (mRNAs) dos genes Rep e Cap são transcritos, e as proteínas são sintetizadas e importadas do citoplasma. A Rep/Rep' ligam-se ao dsDNA e iniciam a replicação do círculo rolante (*rolling circle replication* –RCR) pela introdução de um iniciador (*nick*) que serve como um *primer*. A extensão do *primer* pelas enzimas do hospedeiro leva a replicação. Enquanto isso, a proteína Rep é covalentemente ligada ao DNA e termina a reação pela introdução de uma segunda reação de clivagem via Tyr-93. Eventos que levam à montagem e libertação de virions não foram ainda estudados (Figura 3) (STEINFELDT, et al., 2001; FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2009).

Figura 3 - Ciclo de vida do PCV2

Fonte: FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2009.

1.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO PCV (PCVAD)

Os sinais clínicos e as características patológicas ainda são fundamentais para diagnosticar doenças associadas à infecção por PCV2 (SGALÉS, 2012).

O âmbito clínico-patológico da infecção viral foi expandido ao longo do tempo e desde a primeira descrição da síndrome de refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS), desordens do trato reprodutivo, entérico e respiratório foram, em seguida, associadas ao PCV2. Síndrome de dermatite e nefropatia assim como doenças do imunocomplexo também foram associadas a infecção por este vírus (SEGALÉS et al. , 2004; SEGALÉS, 2012).

Juntas, estas condições foram grupadas e receberam a terminologia doenças do circovírus suíno (*porcine circovirus disease* – PCVD) na Europa (ALLAN et al., 2005) ou doenças associadas ao circovírus suíno (*porcine circovirus-associated disease* - PCVAD) na América do Norte, pela Associação de Veterinários de suínos (*American Association of Swine Veterinarians-AASV*) (OPRIESSNIG et al., 2007).

Os mecanismos precisos pelos quais a infecção em suínos pelo PCV2 desenvolve em subclínica ou clínica (PCVD/PCVAD) ainda não foram totalmente elucidados. Vale lembrar que o papel que desenvolve PCV2 nas doenças, assim como interpretações equivocadas sobre o significado do vírus em determinadas lesões, tem sido assunto controverso durante anos (SEGALÉS, 2012).

1.4 INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR PCV2

Apesar de todos os suínos serem virtualmente infectados pelo PCV2, a alta prevalência de circulação viral foi confirmada pela utilização de métodos de PCR em amostras de sangue ou soro. Em algum ponto durante a fase de crescimento, seja creche ou crescimento/terminação, a maioria, se não todos os animais vão adquirir a infecção (LAROCHELLE et al., 2003; SIBILA et al., 2004; SEGALÉS et al., 2005a), sem necessariamente desenvolver doença (SEGALÉS et al., 2005a, b).

Além disso, métodos quantitativos para a detecção de PCV2 foram desenvolvidos, demonstrando que animais que sofrem de doença sistêmica apresentaram maior carga viral no soro e tecidos do que animais infectados com PCV2 sem a doença clínica (LIU et al., 2000; ROVIRA et al., 2002; BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

Apesar do PCV2 poder atuar como um agente primário, suínos infectados somente com PCV2 desenvolvem frequentemente apenas doença leve ou subclínica (SEGALÉS et al., 2003).

Desta forma, o diagnóstico de infecção subclínica por PCV2 implica que apesar do vírus estar presente, pode não ser responsável pela doença observada no animal (OPRIESSNIG et al., 2007; PALZER et al., 2008; HANSEN et al., 2010).

O desenvolvimento de PCVAD é multifatorial e nem todo suíno infectado pelo PCV2 irá desenvolver a doença clínica, uma vez que a interação do vírus com o hospedeiro e a presença de fatores/co-agentes são necessários (OPRIESSNIG et al., 2007).

De acordo com Opriessnig et al. (2007), basicamente a intensidade da depleção linfóide e da reposição histiocítica modula a viremia, a soroconversão e a eliminação do vírus pelo hospedeiro. Desta forma, animais com baixa viremia apresentam menor soroconversão e conseguem erradicar a infecção sem apresentar PCVAD, constituindo a forma subclínica.

Cenários em que os animais apresentam infecção subclínica indicaram que animais vacinados contra PCV2 foram capazes de aumentar parâmetros produtivos, tais como ganho de peso diário, melhora de condição corporal e carcaça e diminuição da mortalidade, em relação aos animais não vacinados. Entretanto mais estudos são necessários (YOUNG et al., 2011).

1.5 PCV2 ASSOCIADO À INFECÇÃO SISTÊMICA

A infecção sistêmica, anteriormente descrita como síndrome de refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS - *Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*) foi a primeira doença a ser associada ao PCV2. Descrita inicialmente em Saskatchewan (Canadá), desde então foi relatada em vários países da Europa, Ásia e América (HARDING; CLARK, 1997; HARDING et al., 1998).

A infecção sistêmica acomete, principalmente, animais entre 7 e 15 semanas de idade e o diagnóstico definitivo, proposto por Sorden (2000), é baseado nos sinais clínicos que incluem crescimento insuficiente/refugagem, perda de peso com ou sem dispnéia ou icterícia; lesões histológicas caracterizadas por depleção dos tecidos linfoides e/ou substituição histiocitária de folículos em tecido linfóide/inflamação granulomatosa linfocítica; e presença do antígeno/ácido nucleico do PCV2 associado a lesões microscópicas visualizadas por imunohistoquímica (IHS) ou hibridização *in situ* (ISH) respectivamente (SORDEN, 2000; HARDING, 2004; OPRESSNIG et al., 2004b).

Em outros estudos de animais naturalmente infectados e experimentais, os sinais clínicos primários apresentados ainda foram tosse, diarreia e palidez (ROSELL et al., 1999; OPRESSNIG et al., 2004).

Apesar de não consideradas como diagnóstico conclusivo, as alterações macroscópicas que podem ser observadas em necropsias são moderado a severo aumento dos linfonodos, pulmões não colapsados, áreas de consolidação, edema de septos interlobulares; rins aumentados de volume, com pontos brancos, nefrite intersticial; ulcerações gástricas; aumento e descoloração do fígado (ROSELL et al., 1999; SORDEN, 2000; OPRESSNIG et al., 2004b; CORREA et al., 2006; OPRESSNIG et al., 2006; 2007).

Estudos experimentais e à campo, com a finalidade de reproduzir a doença sistêmica, demonstraram que apesar de ser claro que a infecção por PCV2 é um fator necessário, não é suficiente para o desenvolvimento da doença (ALLAN et al., 1999; SORDEN, 2000).

Outros fatores, como co-infecções por outros agentes, dentre eles o Parvovírus suíno (PPV) e o vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva suína (PRRSV) (ALLAN et al., 1999; KENNEDY et al., 2000; HARMS et al., 2001; KRAKOWKA et al., 2001; SORDEN, 2000) estimula/ativa o sistema imunológico e amplifica a replicação do PCV2 gerando a doença sistêmica (ELLIS et al., 2003).

A forma endêmica da doença sistêmica apresenta baixas morbidade e mortalidade. No entanto em surtos epidêmicos podem elevar a mesma em três a quatro vezes em fases pós-desmame (HARDING et al., 1998; OPRESSNIG et al., 2007).

1.6 PCV2 ASSOCIADO À FALHA REPRODUTIVA

O envolvimento de PCV2 em distúrbios reprodutivos foi descrito primeiramente em duas granjas do Canadá em 1999 por West et al. (1999). Posteriormente, relatos semelhantes foram realizados em Iowa, Estados Unidos, e oeste da Europa (HARDING, 2004).

Há indicações de que o vírus associado à distúrbios reprodutivos pode, dependendo do tempo de infecção, se manifestar em todas as fases da gestação (WEST et al., 1999); O'CONNOR et al., 2001) e foram, comumente, observados em marrãs ou em rebanhos novos que, recentemente, foram expostos ao PCV2 (MADSON; OPRESSNIG, 2011).

Podem ocorrer de modo esporádico durante surtos de doença sistêmica, manifestando-se sob a forma de abortamentos, aumento nas taxas de natimortos e fetos mumificados (HARDING et al., 2004), semelhante ao parvovírus suíno (MENGELING, et al., 2005) e aumento da mortalidade pré-desmame (MIKAMI et al., 2005).

O PCV2 pode ser encontrado em diversos tecidos fetais, onde pode ocorrer transmissão vertical e o desenvolvimento de imunotolerância em leitões (HARDING, 2004; MIKAMI et al., 2005; CASTRO et al., 2012).

Em fetos abortados ou leitões natimortos, um achado comum é a miocardite, s que também podem ser encontrado em leitões neonatos sobreviventes (MIKAMI et al., 2005).

A inseminação de marrãs com sêmen contendo grandes quantidades de PCV2 infeccioso pode levar a distúrbios reprodutivos. Entretanto, a disseminação do PCV2 através da inseminação é dose-dependente, uma vez que sêmen contendo carga viral baixa de PCV2, falhou em infectar as porcas (MADSON et al., 2009).

Apesar do envolvimento do PCV2 em distúrbios reprodutivos ser considerado interessante, não é um achado consistente durante os surtos de PCVAD (CASTRO et al., 2012) uma vez que há discrepâncias entre diversos trabalhos (SANCHEZ, et. al., 2001; FARNHAM et al., 2003; MALDONADO et al., 2005; PESCADOR et al., 2007) e podem ser associadas a quantidade de PCV2 presente nos animais e o momento de infecção das marrãs (HANSEN et al., 2010a).

1.7 PCV2 ASSOCIADO À SÍNDROME DE DERMATITE E NEFROPATIA SUÍNA

A síndrome de dermatite e nefropatia é uma doença vascular imunomediada que acomete a pele e rim dos suínos. Originalmente descrita no Reino Unido no ano de 1993 (SMITH et al., 1993), foi associada ao PCV2 apenas em 2000 (ROSSEL, 2000)

Acomete leitões na fase de desmame e crescimento/terminação. Os sinais clínicos mais comuns são o desenvolvimento de lesões cutâneas, redondas ou de formato irregular, avermelhadas escuras que se aglutinam e resultam em manchas e placas maiores. Geralmente são observadas nos membros posteriores, membros dianteiros e abdome, mas podem progredir para tórax, flanco e orelhas (DURAN et al., 1997; THOMPSON et al., 2000). Após o surgimento das lesões cutâneas, o animal apresenta febre, anorexia, perda de peso e letargia vindo a óbito rapidamente (CHAE, 2005).

Nos rins, a infecção pelo PCV2 leva a hipertrofia, palidez e petéquias (DURAN et al., 1997). As lesões microscópicas incluem vasculite e glomerulonefrite (SEGALÉS et al., 1998) em decorrência de reação de hipersensibilidade tipo III com deposição característica de imunoglobulinas e complementos nas áreas de desenvolvimento de lesão como nas paredes dos capilares vasculares e glomerulares (DURAN et al., 1997; LAINSON et al., 2002).

O vírus da PRRSV e bactérias como *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.*, também, foram indicados como possíveis agentes etiológicos da PDNS (OPRIESSNIG et al., 2007).

1.8 PCV2 ASSOCIADO AO COMPLEXO DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS (PRDC)

A PRDC acarreta severo prejuízo econômico, apesar do desenvolvimento contínuo de novas vacinas e antibióticos (STARK, 2000; VAN REETH; NAUWYNCK, 2000; KICH; PONTES, 2001). Nos abatedouros, perdas consideráveis podem ser observadas pelas condenações relacionadas com pneumonias, pleurites e/ou abscessos (BARCELLOS, 2008) e devido a alterações macroscópicas, levando a condenação ou aproveitamento parcial de carcaças (KICH; PONTES, 2001).

Em 1996, na Califórnia - USA, o PCV2 foi associado a lesões presentes em sistema respiratório em um suíno com seis semanas de idade apresentando pneumonia intersticial e

linfadenopatia. O DNA do vírus foi detectado nas amostras de pulmão e linfonodos através da hibridização *in situ*, sendo o vírus considerado agente etiológico das lesões (ALLAN; ELLIS, 2000).

A presença prolongada e incomum da doença clínica respiratória em suínos, com pneumonia broncointersticial granulomatosa e bronquiolite, fibrose bronqueolar e antígenos de PCV2, sugere que o vírus desempenhe uma função na PRDC (OPRIESSNIG et al., 2007).

A PRCD é considerada uma síndrome respiratória multi-etiológica, observada, principalmente, em animais de crescimento e terminação entre oito e vinte seis semanas de idade. Pode estar associada com múltiplos patógenos respiratórios como vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), vírus da Influenza suína (SIV), *Mycobacterium hyopneumoniae* e *Pneumocystis carinii*. Os sinais clínicos incluem diminuição da taxa de crescimento, diminuição da eficiência alimentar, anorexia, febre, tosse e dispnéia (ELLIS et al., 1998; HARMS et al., 2001; CHAE, 2004; OPRIESSNIG et al., 2007; 2008).

Os achados macro e microscópicos dependem do número de patógenos que afetam o animal. No entanto, dificilmente distinguem-se PRDC e doença sistêmica, uma vez que ambos são clinicamente muito semelhantes (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

Desta forma, o diagnóstico da PRDC sugerido por Kim et al. (2003) deve seguir quatro critérios: (i) presença dos sinais respiratórios como dispneia prolongada refratária a antibiótico-terapia, (ii) presença de lesões microscópicas características como broncointersticial pneumonia, incluindo fibrose peribronquial e peribronquiolar (iii) presença do PCV2 nas lesões de pulmão e (iv) ausência de lesões microscópicas características de doenças sistêmicas em tecido linfóide. Os quatro critérios separadamente não são diagnóstico de PCV2-associado à PRDC

A forma severa de pneumonia intersticial é denominada pneumonia proliferativa necrozante (PNP), descrita pela primeira vez em 1990 no Canadá, em unidades de creche e terminação (MORIN et al., 1990; GRAU-ROMA; SEGALÉS, 2007).

Pulmões com PNP são extensivamente afetados, onde as lesões macroscópicas variam de acordo com o estágio da doença, como ausência de colapso pulmonar, consolidação

dos lobos, cor vermelho ou cinza, de aspecto úmido e consistência firme. Edema interlobular, também, é um problema comum (MORIN et al., 1990; GRAU-ROMA; SEGALÉS, 2007).

1.9 PCV2 ASSOCIADO À ENTERITE

PCV2 associado à enterite afeta animais a partir de oito a 16 semanas de idade. Clinicamente pode ser confundida com outro agente bacteriano, a *Lawsonia intracellularis*. Os achados macroscópicos incluem espessamento de mucosa intestinal e aumento dos linfonodos mesentéricos. Histopatologicamente é caracterizada por graus variáveis de histiocitose, com presença de PCV2 nas células da submucosa, lâmina própria e epitélio da cripta, bem como no tecido linfoide (JENSEN et al., 2006).

Trabalho realizado por Kim et al. (2003b) em animais com epizootia de diarreia propõem que o diagnóstico de PCV2-associado a enterite deveria ser feito com base em três critérios: (i) a presença de diarreia; (ii) a presença de lesões microscópicas características nas placas de Peyer, mas não nos linfonodos; e (iii) presença de PCV2 dentro dessas lesões. Esses três critérios individualmente não são diagnósticos de PCV2 associada enterite.

1.10 EPIDEMIOLOGIA

A infecção por PCV2 é generalizada no mundo todo e se aproxima de 100% em algumas granjas. No entanto, a morbidade é baixa e apenas uma pequena proporção de animais infectados (5 - 30 %) desenvolve sinais clínicos de PCVAD (SEGALÉS et al., 2005a; GRAU-ROMA et al., 2011; MENG, 2012).

Muitos fatores relacionados à transmissão e patogênese do PCV2 contribuíram para sua rápida dispersão dentro da indústria suína no mundo todo. O PCV2 é estável dentro das granjas e possui uma grande capacidade de dispersão dentro dos sistemas de produção suína

por contato direto com animais infectados (via oronasal, fecal e urinária), transmissão vertical de suíno para leitões e via sêmen (HARDING, 2004; MIKAMI, 2005; SEGALÉS et al., 2005; MADEC et al., 2008; MADSON et al., 2009b; CASTRO et al., 2012).

Estudos realizados por Segalés et al. (2005) a respeito das vias de eliminação do vírus em associação a quantidade de DNA viral encontrado demonstraram que, além de potenciais rotas de eliminação viral, as quantidades de PCV2 eliminados por secreções oronasais, urina e fezes são maiores em animais apresentando a doença sistêmica do que em animais subclínicos.

A viremia ocorre entre a 7ª e 16ª semana de idade, apresentando baixa prevalência em matrizes. Porém, a variação individual na detecção do DNA de PCV2 pode ser de cinco a 21 semanas, demonstrando que alguns suínos podem desenvolver uma viremia persistente (SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

Em condições naturais, a soroconversão ocorre em leitões de três e quatro semanas pós desmame e os anticorpos são detectados em suínos nas diferentes fases da criação (ALLAN; ELLIS, 2000). Devido ao fato de quase todos os suínos em fase de reprodução serem soropositivos para o PCV2, muitos leitões já nascem com anticorpos maternos contra o vírus (MCKEOWN, 2005).

Em geral, suínos que são capazes de desenvolver uma resposta imune bem sucedida, limitam a infecção, enquanto que aqueles que têm uma resposta imune diminuída podem desenvolver a doença clínica (MEERTS et al., 2006; FORT et al., 2007; GAUGER et al., 2011).

1.11 DIAGNÓSTICO

PCV2 pode ser encontrado em suínos saudáveis e doentes, desta forma, a escolha e interpretação de testes de diagnóstico são importantes para confirmação da PCVAD. PCVAD (infecção sistêmica, enterite, pneumonia, PDNS e aborto) é diagnosticada pela demonstração de lesões características associada com antígeno ou ácido nucleico do PCV2 nos respectivos

órgãos. Atualmente, a IHC ou ISH são considerados o padrão ouro para a detecção de PCV2 como parte do diagnóstico de PCVAD (SORDEN et al., 2000; THONSON et al., 2000; OPRESSNIG et al., 2007). As demais técnicas empregadas para o PCV2 incluem:

1) Isolamento viral: não realizado rotineiramente, pois é demorado e nem sempre eficiente, uma vez que o vírus deve ser viável e o trânsito prolongado e autólise dos tecidos enviados por correio diminuem, ainda, mais o sucesso do isolamento do vírus (ALLAN e ELLIS, 2000);

2) Métodos indiretos: considerados principais, a imunofluorescência indireta (IFI), a imunoperoxidase (IP) e ELISA que, embora o PCV2 induza a produção de anticorpos, detecção desses anticorpos não possuem valor diagnóstico devido a prevalência do vírus em animais clinicamente saudáveis. Contudo, a mensuração de anticorpos PCV2 específicos são úteis durante estudos da patogênese e epizootias ou para avaliar a eficácia de vacinas. (ALLAN et al., 1999; RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2000; NAWAGITGUL et al., 2002; BLANCHARD et al., 2003);

3) Métodos diretos: Microscopia eletrônica, utilizado para demonstrar partículas de circovírus diretamente dentro da célula e para estudar a estrutura e tamanho do vírus; e PCR, consiste na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, no caso material genético do organismo pesquisado, visando à produção de milhões de cópias desta sequência *in vitro* (FARAH, 1997). Variantes da PCR convencional incluem: (i) *Multiplex*-PCR: mais de uma sequência alvo é detectada em uma única reação; ii) *nested*-PCR: aumenta a capacidade de detectar pequenas quantidades da sequência alvo; iii) PCR quantitativa que, como o próprio nome define, permite quantificar PCV2 em amostras clínicas de animais infectados e pode ser utilizada para distinguir entre a forma clínica e subclínica da infecção por PCV2; iv) *Reverse transcription*-PCR utilizado na detecção de RNA do PCV2 presente apenas durante a replicação; v) RFLP-PCR, que detecta fragmentos polimórficos obtidos pelo corte da fita de DNA com enzimas de restrição (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004; ROVIRA et al., 2002; SEGALÉS et al., 2005b; OPRESSNIG et al., 2007);

1.12 CONTROLE

O controle do PCV2 é multifatorial, complexo e envolve uma eficiente ativação do sistema imune. Atualmente baseia-se no uso de vacinas comerciais divididas em três tipos: produzidas em cultivos celulares para uso em porcas (Merial), produzidas em baculovírus, para uso em leitões (Boehringer e Intervet Schering-Plough) e quimera, entre PCV1 e PCV2, também para uso em leitões (Fort Dodge) (BARCELLOS et al., 2009).

A implementação da vacinação para PCV2 em suínos afetados pela PRDC, reduziu substancialmente a incidência de doenças respiratórias e co-infecções pulmonares (OPRIESSNIG, et al., 2011).

A redução de lesões em pulmão, dispersão do vírus pelas fezes e quantidades de DNA viral no soro e tecidos linfoides também foram relatados (OPRIESSNIG et al. 2007; 2008).

As vacinas atuais são baseadas no genótipo PCV2a e demonstram conferir imunidade contra o PCV2b (FORT et al., 2009; OPRIESSNIG et al., 2009; SEGALÉS et al., 2009). No entanto, os perfis antigênicos de PCV2a e PCV2b não são idênticos (CHEUNG et al., 2007; DUPONT et al., 2008), e estudos a respeito de novas vacinas com base no genótipo PCV2b que, poderiam proporcionar imunidade superiores contra genótipo de PCV2b, estão sendo realizados (NATHAN et al., 2012).

Além da vacinação para PCV2, o uso de vacinas e tratamentos direcionados para as co-infecções virais e bacterianas, também, diminuem o impacto do PCV2 nas granjas (OPRIESSNIG et al., 2007).

Apesar de muito resistente a desinfetantes e detergentes comuns (ALLAN; ELLIS, 2000) devido a ausência do envelope externo, em estudo realizado por Royer et al. (2001), concluiu-se que os títulos virais de PCV2, reduziram, significativamente pelo uso de desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), VirkonR S (agente oxidante), RoccalR D Plus e FulsanR (amônio quaternário), CloroxR Bleach (hipoclorito de sódio), 1-Stroke EnvironR (fenol) e Tek-TrolR (fenol).

As práticas de manejo, também, devem ser consideradas. O plano dos “20 pontos de Madec” contempla a diminuição estresse animal, eliminação das co-infecções e minimização dos fatores que induzem a estimulação do sistema imunológico (MADEC et al. 2008).

2 OBJETIVO

1. Pesquisar a presença de PCV2 em amostras com e sem lesões pneumônicas macroscópicas, oriundas de abatedouros localizadas no Estado de São Paulo, utilizando a técnica de PCR.

2. Verificar associação entre PCV2 e lesões pneumônicas macroscópicas através do teste de Qui-quadrado (χ^2).

3. Genotipar, através do sequenciamento, as amostras de PCV2 detectadas em pulmões com e sem lesões pneumônicas macroscópicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E MACERAÇÃO

Durante o período de Agosto de 2010 à Janeiro de 2011, foram coletadas 200 amostras de pulmão (Apêndice A) provenientes de seis abatedouros de suínos e cinco granjas positivas para PCV2 localizados no Estado de São Paulo (Figura 4), divididas em dois grupos (A e B). Grupo “A”: composto de 100 animais com lesões pneumônicas macroscópicas sugestivas de PCV2 e grupo “B” 100 animais com ausência de lesões.

Figura 4 - Origem das amostras de pulmão com e sem lesão pneumônica dentro do Estado de São Paulo

Fonte: FERRARI, 2012.

Os animais oriundos de Itú, Espírito Santo do Pinhal, Óleo e Holambra não foram vacinados. Os animais de Fartura foram vacinados com a vacina Circumvent® (Intervet Schering-Plough).

Fragmentos internos das amostras de pulmão foram retirados, utilizando-se pinças e tesouras estéreis, e colocados em sacos para *stomacher*, também, estéreis.

As amostras foram maceradas em um homogeneizador de órgãos (Stomacher 80 Seward/Lab System) em 20 % (p/v) em TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0), aliquotadas em microtubos de 1,5 µL e armazenadas a -20°C até a realização de extração do DNA.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído das amostras através do procedimento descrito por Sambrook e Russel et al. (1989) seguindo as etapas de execução descritas a seguir.

Em 100 µL da amostra foi adicionada 400 µL de uma solução de lise contendo Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS, proteinase K e água ultra-pura. Após homogeneização e incubação em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por duas horas, foi adicionado 250 µL de clorofórmio e 250 µL fenol. O material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos para separar as fases. A fase aquosa, resultante da fase anterior, foi transferida para outro microtubo de 1500 µL, com 400 µL de propanol, homogeneizado por inversão e incubado por um período mínimo de duas horas a -20°C. Após esse período, o material foi centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 25 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado com 950 µL de etanol 70 %, centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, novamente, por inversão. O sedimento foi seco em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10 minutos, suspenso em 30 µL de TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e incubado em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10 minutos. O DNA viral foi mantido a -20°C até o momento do uso.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

3.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se o par de *primers* Fa2/Ra2 que amplificam um fragmento de 476 pb do PCV2 (CASTRO, 2005) (Quadro 1 e Apêndice C). Como controles, positivos e negativos, foram utilizados uma amostra positiva de PCV2 e água ultra-pura, respectivamente.

Quadro1- Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de *primers* Fa2/Ra2 utilizados para detecção do PCV2

Primers	Alvo	Orientação	Seqüência 5' - 3'(nt)	Fragmento (pb)
Fa2/	ORF-1	Senso	ATT ACC AGC AAT CAG ACC CCG T	467
Ra2	ORF-2	Antisenso	CAA CCC TTC TCC TAC CAC TCC	

Fonte: Castro, 2005.

Condições de amplificação: foram utilizados 5 µL de DNA num volume final da reação de 50 µL contendo 0,2 mM de dNTPs, 1 x *Reaction Buffer* (Invitrogen™), 50 pmoles de cada *primer* (Quadro 1), 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura q.s.p. em 50 µL.

O material foi amplificado num termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 40 x 95°C por 1 minuto, 51°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.2 Determinação da sensibilidade analítica dos *primers* Fa2/Ra2.

Para determinação da sensibilidade analítica dos *primers* de detecção Fa2/Ra2 do PCV2, foram realizadas as etapas descritas a seguir:

3.3.3 Detecção, purificação e quantificação do produto amplificado pela PCR

Uma amostra de PCV2 positiva foi escolhida aleatoriamente para a realização da sensibilidade analítica. Após a realização da PCR (item 3.3.1), os fragmentos amplificados (*amplicon*) de 476 pb foram submetidos a uma migração eletroforética em gel de agarose a 1,5 % (item 3.3.6) e purificados com o *kit* comercial GFX PCR DNA *Gel Band Purification Kit* (Amershan Pharmacia Biotech®) de acordo com as especificações do fabricante.

A concentração total de DNA foi medida em espectofotômetro Nanodrop™ (Thermo Scientific), utilizando comprimento de onda de 260 nm.

3.3.4 Inserção no plasmídeo, transformação bacteriana e extração plasmidial

Com o objetivo de aumentar a concentração dos *amplicons*, os mesmos foram clonados em plasmídeos previamente à realização do sequenciamento.

Os fragmentos purificados foram inseridos (na região *lacZ*) em vetor plasmidial pTZ57R/T (na proporção plasmídeo-inserto de 1:3) utilizando-se o *kit* comercial InsTaclone™ (Fermentas, Maryland, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante.

Para tanto, 10 µL de cada reação de ligação foram adicionados à 100 µL de *E. coli* JM 109 competente e incubados durante 30 minutos em gelo. A seguir, as amostras foram

submetidas a um choque térmico à 42°C por 2 minutos e, imediatamente, colocadas no gelo durante 2 minutos. As bactérias transformadas foram cultivadas em 900 µL de meio SOC à 37° C à 150 rpm por 1 hora e 30 minutos. Após este período, 100 µL de JM 109 transformadas foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo 50 µg/mL de ampicilina, IPTG (0.5 mM) e X-Gal (40 µg/mL).

O sucesso da clonagem interrompe a sequência codificadora da enzima β-galactosidase, codificada na região do gene *lacZ* do plasmídeo. Assim, as colônias transformadas não possuem a capacidade de metabolizar o substrato X-Gal transformando em 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, um produto azul insolúvel. A triagem dos clones é então baseada em cores (azul/branca), onde as colônias brancas (bactérias competentes) são selecionadas.

Finalmente, os clones selecionados foram submetidos à PCR utilizando os *primers* M13/pUC (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') senso e M13/pUC (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') antisenso direcionados para a região flangeadora da inserção do plasmídeo, de acordo com as instruções do fabricante (Figura 5), para confirmação da presença do inserto.

Em seguida, os clones contendo os fragmentos desejados foram cultivados em meio líquido LB contendo 50 µg/mL de ampicilina por 12 horas. A extração plasmidial foi realizada utilizando-se o *kit* comercial NucleoSpin Plasmid™ (Macherey Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a uma migração eletroforética em gel de agarose a 1,5 % e purificados com o *kit* comercial GFX PCR DNA *Gel Band Purification Kit* (Amershan Pharmacia Biotech®) de acordo com as especificações do fabricante.

Figura 5 – Representação da região de ligação do fragmento de 476 pb no vetor plasmidial pTZ57R/T

Fonte: adaptado *Kit comercial GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit* (Amershan Pharmacia Biotech®)

Os fragmento purificados foram sequenciados com os *primers* Fa2/Ra2 (itens 3.3.1). As sequências dos clones obtidas foram submetidas aos programas disponíveis nos sites <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, a fim de verificar sua similaridade junto às sequências disponíveis no GenBank, e <http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html> para o cálculo do peso molecular e tamanho do fragmento obtido.

O número de cópias de DNA viral foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$N = \frac{C \times 6.10^{23}}{M}$$

Onde: N = número de cópias do DNA viral no plasmídeo extraído; C = concentração do plasmídeo medida em espectrofotômetro (g); 6×10^{23} = constante de Avogrado (número de moléculas de DNA em 1 Mol); M = massa molecular do plasmídeo + vetor em g/M (calculado por <http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html>).

Diluições seriadas do plasmídeo foram realizadas de $10^{-1} - 10^{10}$ (equivalente ao intervalo variando de $10^9 - 10^0$ molécula viral). A sensibilidade analítica calculada foi correspondente a maior diluição do plasmídeo onde o fragmento de DNA do tamanho esperado, pôde ser visualizado após migração eletroforética.

3.3.5 Controle endógeno

Assim como outras técnicas utilizadas no diagnóstico de enfermidades, são necessárias medidas para controlar os resultados falsos positivos e/ou negativos. O controle de falso positivo, que pode ser resultante da introdução acidental de um contaminante durante o processo, é realizado adicionando-se, a cada cinco amostras, água ultra-pura autoclavada no lugar da amostra na reação (ROSENSTRAUS et al., 1998).

O resultado falso negativo ocorre pela degradação do ácido nucléico alvo e/ou presença de substâncias que inibem a reação como hematina e o cálcio. A sua ocorrência pode ser excluída mediante o uso de um controle endógeno (HOORFAR et al., 2004; OPEL et al., 2011).

A PCR para o controle endógeno foi realizada utilizando o par de *primers* AC1/AC2 (HUI et al., 2004) que amplifica um fragmento de 850 pb do gene da β -actina (Quadro 2). Como controles negativos foram utilizados água ultra-pura a cada cinco amostras.

Quadro 2 - Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de *primers* AC1/AC2 utilizados para detecção do gene β -actina.

<i>Primers</i>	Alvo	Orientação	Seqüência 5' - 3'(nt)	Fragmento (pb)
AC1/	gene β -actina	Senso	TGA GAC CTT CAA CAC GCC	850
AC2	gene β -actina	Anti-senso	ATC TGC TGG AAG GTG GAC	

Fonte : HUI et al., 2004.

A reação foi realizada nas mesmas concentrações descritas para detecção do PCV2 com o seguinte ciclo: 95°C por 5 minutos, 39 x 95°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.3.6 Detecção do produto amplificado pela PCR

Os fragmentos amplificados (PCV2 e Controle Endógeno) foram analisados através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5 % e imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045 M Tris-borato, 1 mM EDTA) a uma tensão elétrica adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm de gel).

A visualização foi realizada através de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 µg/mL (SAMBROOK et al., 1989). As dimensões dos amplificados foram comparadas a um padrão (Low Mass DNA Ladder da Life Technologies BrasilTM, Estados Unidos) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas a cada corrida eletroforética (Figura 6 e 7). Os géis foram fotodocumentados com Alphaimager[®] da Alpha Innotech.

Figura 6 - Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb. Amostras 36, 38, 42, 66, 113, 137, 138, 140, 141, 142, 159, 160 e 161 foram amplificadas para controle endógeno (850 pb).

Fonte: FERRARI, 2012.

Figura 7 - Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb. Amostras 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157 e 158 foram amplificadas com *primers* Fa/Ra (476 pb); Controle negativo: N1 e N2.

Fonte: FERRARI, 2012.

3.4 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA PCR

3.4.1 PCR

3.4.1.1 Oligonucleotídeos Iniciadores e Condições de Amplificação

As amostras positivas para PCV2 foram submetidas às PCRs para o sequenciamento do PCV2 com os pares de *primers* P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8 descrito no quadro 3 (AN et al., 2007) (Apêndice C)

Quadro 3- Região alvo, sequência e tamanhos dos fragmentos amplificados dos pares de *primers* P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8 utilizados para sequenciamento total do PCV2

<i>Primers</i>	Alvo	Orientação	Seqüência 5' - 3'(nt)	Fragmento (pb)
P1/	ORF-1	Senso	TAA TCC TTC CGA AGA CGA GC	629
P2	ORF-1	Antisenso	CGA TCA CAC AGT CTC AGT AG	
P3/	ORF-1	Antisenso	CAG AAG CGT GAT TGG AAG AC	630
P4	ORF-1	Antisenso	ATG TAG ACC ACG TAG GCC TC	
P5/	ORF-2	Senso	AGA AGC TCT TTA TCG GAG GA	701
P6	ORF-2	Antisenso	AAG CGA ACC ACA GTC AGA AC	
P7/	ORF-2	Senso	CTA GAA TAA CAG CAC TGG AG	621
P8	ORF-2	Antisenso	GTT CGT CCT TCC TCA TTA CC	

Fonte : adaptado AN et al., 2007.

Para a PCR, foram adicionados 5 µL do DNA extraído num volume final de 50 µL de reação contendo: 0,2 mM de dNTPs, 1 x *Reaction Buffer* (Invitrogen™), 50 pmoles de cada *primer* (Quadro 3), 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura q.s.p.

A amplificação do DNA foi realizada por um termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research) utilizando os ciclos descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Condições utilizadas para amplificar diferentes fragmentos do PCV2. Detecção do produto amplificado pela PCR

<i>Primers</i>	Desnaturação inicial	40 ciclos			Extensão final
		Desnaturação de DNA	Hibridação dos <i>primers</i>	Polimerização	
P1/P2	95 °C/ 5 min.	95 °C/30 seg.	52 °C/30 seg	72 °C/1 min	72 °C/5 min.
P3/P4					
P5/P6	95 °C/ 5 min.	95 °C/ 5 min.	49 °C/30 seg	72 °C/1 min	72 °C/5 min.
P7/P8					

Fonte: AN et al., 2007.

Os fragmentos amplificados foram submetidos a uma migração eletroforética em gel de agarose a 1,5 % e purificados com o *kit* comercial GFX PCR DNA *Gel Band Purification Kit* (Amershan Pharmacia Biotech®) de acordo com as especificações do fabricante.

3.4.2 Reação de Sequenciamento

Os fragmentos amplificados pela PCR (item 3.4.1.), depois de purificados e quantificados, foram utilizados nas reações de sequenciamento automático.

Num volume final de 10 μ L foi utilizado 1 μ L de *Big Dye v 3.1 (TM Terminator-cycle sequencing ready reaction* - Applied Biosystems), 2 μ L de tampão *Save Money 5x* (200mM de Tris, 5mM de $MgCl_2$, pH 9,0), 10 pmoles dos *primers* (Quadro 3) e 24 ng de DNA purificado.

As condições da reação de sequenciamento: 96°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado à temperatura ambiente com 30 μ L de etanol a 100 %. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida foram centrifugadas a 12°C a 14.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi lavado com 65 μ L de etanol a 70 %, centrifugado a 12°C a 14.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi seco em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 95°C por 10 minutos para evaporar o etanol residual e mantido a temperatura de – 20° C até o momento da utilização.

A corrida foi realizada em um sequenciador capilar Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems™).

3.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE PCV2 DETECTADO ATRAVÉS DA PCR E LESÕES EM PULMÃO

A frequência de ocorrência de PCV2 foi determinada entre o número de amostras positivas pela PCR em pulmões com e sem lesões pneumônicas macroscópicas, determinando-se a significância das diferenças encontradas com a aplicação do teste de Qui-quadrado (χ^2) utilizando-se valor de p crítico = 0,05 com o programa Minitab® 15.1.0.0. (© 2006 Minitab Inc.).

3.6 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

3.6.1 Montagem das sequências consensos

Após determinar as sequências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados pela reação de PCR (item 3.4.1.) através da reação de sequenciamento (item 3.4.2.), as mesmas foram submetidas ao programa computacional PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) para análise da qualidade da leitura dos eletroesferogramas, sendo aceitas somente as que obtiverem pontuação $\geq$ a 20, que representa a probabilidade de uma determinada base estar errada em mil.

As sequências consenso foram geradas com o auxílio do programa computacional CAP 3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>).

3.6.2 Alinhamento das sequências

As sequências obtidas no presente trabalho, juntamente com 154 sequências homólogas utilizadas no trabalho de Olvera et al. (2007), seis sequências brasileiras de Ciacci-Zanella et al. (2009) e duas sequências dinamarquesas de PCV2c (EU148504; EU148505) do trabalho de Dupont et al. (2008) recuperadas do GenBank, foram alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). Como sequências de referência foram utilizadas PCV2a (AF055392) do Canadá, PCV2b (AF055394) da França, PCV2c (EU148503) da Dinamarca (Segalés et al., 2008) (Apêndice B).

3.6.3 Diagrama de identidade e similaridade de nucleotídeos e aminoácidos

A identidade de nucleotídeos entre os experimentos e sua respectiva amostra original foi calculada com o programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999).

As sequências geradas foram traduzidas para aminoácidos com programa Bioedit 7.0.5.3 (HALL, 1999) e alinhadas com os mesmos utilizando-se a matriz BLOSUM 62.

3.6.4 Construção na árvore genealógica

As sequências alinhadas pelo método descrito no item 3.6.3, foram utilizadas para a construção da árvore genealógica de distância, através do algoritmo *Neighbor-Joining* e o modelo evolutivo segundo determinado com o aplicativo *FindModel* (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/findmodel/findmodel.html>), utilizando-se o programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004) com 1000 repetições de *bootstrap*.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA.

Utilizando-se a fórmula descrita no item 3.3.4, o número de cópias do DNA viral calculado para o plasmídeo purificado foi de:

$$N = \frac{6.10^{-8} \times 6.10^{23}}{1.10^6}$$

$$N = 3,6 \times 10^{10}$$

A diluição de 10^{-1} à 10^{-10} , corresponde a $3,6 \times 10^9$ a $3,6$ moléculas de PCV2, e foi utilizada para determinar o limiar de detecção da reação. A sensibilidade analítica da PCR com os *primers* Fa2/Ra2 foi de 360 moléculas de DNA de PCV2, correspondente à diluição 10^{-8} (Figura 8).

Figura 8 - Gel corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultra-violeta e com um padrão molecular (L) de 100 pb

Fonte: FERRARI, 2012. Legenda: Diluições seriadas na base de 10 (10^{-1} a 10^{-11}) do DNA alvo (plasmídeo com inserto de PCV2) utilizados para determinar o limiar de detecção da PCR utilizando os *primers* Fa2/Ra2 que amplificam um fragmento de 476 pb.

4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE PCV2 DETECTADO ATRAVÉS DA PCR E LESÕES EM PULMÃO.

Do total de 200 amostras de pulmão coletadas em abatedouros localizados no Estado de São Paulo, 88,5 % (177/200) foram positivas para PCV2, e 11,5 % (23/200) foram negativas (Figura 8).

Lesões pneumônicas macroscópicas foram observadas em 51 % (91/177) e 49 % (86/177) das amostras positivas e negativas para PCV2 por PCR, respectivamente. Não houve associação significativa entre a positividade da PCR e presença ou ausência de lesões pneumônicas macroscópicas ($p=0,26$) pela aplicação do teste Qui-quadrado (χ^2).

As 23 amostras negativas para PCV2 foram submetidas a uma PCR para detecção da β actina (controle endógeno), sendo todas positivas, descartando, portanto, a possibilidade de resultados falsos negativos.

Figura 9 - Distribuição das amostras positivas e negativas para PCV2 em pulmão com presença ou ausência de lesões pneumônicas macroscópicas

Fonte: FERRARI, 2012.

Com relação à origem das amostras, 29 % (40/177), 27 % (37/177), 27 % (37/177), 26 % (36/177) e 20 % (27/177) das amostras positivas foram do município de Holambra, Óleo, Itú, Fartura e Espírito Santo do Pinhal, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição das amostras positivas para PCV2, oriundas de Holambra, Óleo, Espírito Santo do Pinhal, Itú e Fartura

Fonte: FERRARI, 2012.

4.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DE PCV2

Dez amostras positivas de cada região (cinco com lesão e cinco sem lesão pneumônica macroscópica) foram, aleatoriamente, selecionadas para sequenciamento do PCV2.

Vinte e duas das 50 amostras tiveram o genoma completo do PCV2 sequenciado e cinco amostras tiveram a ORF-2 completa sequenciada (Tabela 4).

Quadro 5 - Detalhamento das 27 amostras positivas para PCR submetidas ao sequenciamento, seguindo: Identificação, lesão em pulmão, granja de origem e comprimentos dos fragmentos sequenciados

Identificação da amostra	Lesão em pulmão	Origem	Região alvo sequenciada	Nucleotídeos
1	presente	Itú		
2	presente	Itú		
4	presente	Itú		
12	ausente	E. S. Pinhal		
14	ausente	E. S. Pinhal		
15	ausente	E. S. Pinhal		
62	presente	Itú		
78	ausente	Itú		
79	ausente	Itú		
97	presente	Óleo		
98	presente	Óleo	ORF-1 e 2	1767 nt
100	presente	Óleo		
118	ausente	Óleo		
120	ausente	Óleo		
157	presente	E. S. Pinhal		
158	presente	E. S. Pinhal		
162	presente	E. S. Pinhal		
177	ausente	Holambra		
181	ausente	Holambra		
185	ausente	Holambra		
196	presente	Holambra		
204	presente	Holambra		

Identificação da amostra	Lesão em pulmão	Origem	Região alvo sequenciada	Nucleotídeos
116	ausente	Óleo		
156	presente	E. S. Pinhal		
163	presente	E. S. Pinhal	ORF-2	699 nt
199	presente	Holambra		
201	presente	Holambra		

Fonte: FERRARI, 2012.

4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE PCV2

4.4.1 Análise da ORF-1 das sequências completas de PCV2

As vinte e duas sequências completas tiveram 945 nt sequenciados (amostras 1, 2, 4, 12, 14, 15, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 157, 158, 162, 177, 181, 185, 196 e 204) correspondentes à ORF-1 (Apêndice D).

A partir da matriz de identidade da ORF-1 entre 22 sequências completas, verificou-se uma identidade nucleotídica que variou de 97,5 % à 100 % (Apêndice E). A identidade entre aminoácidos, dessa mesma região, variou 99 % à 100 % (Apêndice F).

As sequências que apresentaram identidade nucleotídica de 100 % formaram os seguintes grupos: (i) amostras 1 e 4; (ii) amostras 12 e 15; (iii) amostras 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118 e 120; (iv) amostras 158 e 162; (v) amostras 177 e 204 e (vi) amostras 181 e 196.

As sequências que apresentaram identidade aminoácido de 100 % entre si foram divididas nos seguintes grupos: (i) amostras 1, 4, 157, 158 e 162; (ii) amostras 12 e 15; (iii) amostras 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118 e 120; (iv) amostras 158 e 162; (v) amostras 2, 177, 181, 185 e 204.

As sequências desse estudo foram, também, confrontadas com sequências de ORF-1 obtidas de animais com sinais clínicos de PCVAD. A identidade nucleotídica entre as 22 sequências e as disponíveis GenBank (item 3.6.2) de outros países variou entre 95 %

(AF364094 - Taiwan) e 99,8 % (EU057188 – Brasil; AY424404 e AY424405 – Áustria; AF538325, AY122275, AY177626, AY181945, AY291316, AY536756, AY641542, AY682990, AY682993, AY849938 e AY969004 – China; AY321991, AY321997, AY321998, AY322002, AY321985, AY321986, AY321987, AY321988 e AY321989 – França; AY484409 e AY484414 – Holanda; AY256460 – Hungria; AF118097, AF408635 e AF055392 – Canadá; AF264038, AF264039, AY094619, AY699793 – Estados Unidos). A identidade de aminoácido, entre as mesmas sequências, variou de 90,6 % (AF364094 - Taiwan) a 100 % (EU057188– Brasil; AY641542 – China; AY321990, AY321991, AY321992, AY321994, AY321999, AY3212000, AY3212001, AF055394, AY321993 – França; AF264038, AF264039, AY699793 – Estados Unidos; AF118097, AF408635 e F055392 – Canadá; AY256460 – Hungria).

Ressalta-se que as sequências de ORF-1, recuperadas do GenBank, que apresentaram identidade nucleotídica de 100 % entre si, não entraram na análise.

4.4.2 Análise da ORF-2 das sequências completas de PCV2

As 22 amostras que tiveram 699 nt sequenciados, correspondentes à ORF-2, foram: amostras 1, 2, 4, 12, 14, 15, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 157, 158, 162, 177, 181, 185, 196 e 204. A identidade nucleotídica e de aminoácido, entre si, variou de 98,1 % à 100 % (Apêndice 8) e 97,4 % à 100 %, respectivamente.

As sequências com 100 % de identidade de nucleotídeo foram agrupadas conforme demonstrado a seguir: (i) amostras 12 e 15; (ii) amostras 62, 78 e 79; (iii) amostras 97, 98 e 120; (iv) amostras 100 e 118; (v) amostras 162, 157 e 158; (vi) amostras 177, 181, 196 e 204.

Com relação à identidade de aminoácidos, os grupos de sequências com 100 % de identidade foram composto pelas seguintes amostras: (i) amostras 1, 97, 98, 100, 120, 157, 162, 181, 185, 196, e 204; e (ii) amostras 78 e 79

As 22 sequências de ORF2 foram confrontados com sequências de outros países, de animais com sinais clínicos variados ou subclínicos, recuperadas do GenBank (item

3.6.2.). A identidade de nucleotídeos variou entre 89,4 % (EU148503 - Dinamarca) e 99,8 % (AY424405 – Áustria; AY579893, AY682990, AY691169, AY849938, - China; AY321995, AY321997, AY322000, AY322002, AF055394 – França; AY484407, AY484414, AY484416 – Holanda). A identidade de aminoácido variou entre 83,3 % (EU148504 e EU148505 – Dinamarca) e 100 % (AY391729 - China e AF055394 – França).

As sequências de ORF-2 que apresentaram identidade nucleotídica de 100 % entre si, não entraram na análise.

4.5 ANALISE DA ORF-2 DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS E PARCIAIS DE PCV2

Vinte e sete sequencias de ORF-2 completa, com 699 nt, foram obtidas, onde 22 foram resultado do sequenciamento completo das amostras e cinco do sequenciamento parcial (Apêndice G).

A identidade nucleotídica e de aminoácidos, entre as 27 ORF-2, variou de 98,1 % à 100 % (Apêndice H) e de 96,9 % à 100 %, respectivamente (Apêndice I).

As sequências que apresentaram identidade nucleotídica de 100 % entre si foram divididas nos seguintes grupos: (i) amostras 78 e 79; (ii) amostras 97, 98 (iii) amostras 157 e 162; (iv) amostras 181, 196, 199, 201 e 204.

As sequências que apresentaram identidade de aminoácidos de 100 % entre si foram divididas nos seguintes em grupo: (i) amostras 1, 97, 98, 100, 120, 157, 162, 181, 185, 196, 199, 201 e 204; e (ii) amostras 78 e 79.

A ORF-2 das 27 amostras, quando analisadas juntamente com sequências de outros países, de animais com sinais clínicos variados ou subclínicos, recuperadas do GenBank (item 3.6.2.), apresentaram identidade de nucleotídeos variando entre 89,4% (EU148503 - Dinamarca) e 99,8% (AY424405 – Áustria; AY579893, AY682990, AY691169, AY849938, - China; AY321995, AY321997, AY322000, AF055394 – França; AY484407, AY484414,

AY484416 – Holanda). Com relação à identidade de aminoácido, esta variou entre 83,3 % (EU148504 e EU148505 – Dinamarca) e 100 % (AY391729 - China e AF055394 – França)

O alinhamento dessas 27 sequências com a de PCV2b do GenBank (FJ905468), permitiu identificar 14 transições de nucleotídeos, que resultaram em duas substituições de aminoácidos, sendo uma Lisina (K) por arginina (R) e uma alanina (A) por treonina (T). Além disso, cinco transversões resultaram na substituição de uma Glicina (G) por alanina A (Quadro 5). As substituições dos aminoácidos ocorreram nas posições dos códons 20, 63, 190 (Figura 11).

Figura 11 - Alinhamento dos aminoácidos da região ORF-2 das 27 amostras de PCV2 isoladas. Os códons 20, 63 e 190 apresentando substituições dos aminoácidos estão representadas pelos círculos

Fonte: FERRARI, 2012.

Quadro 6 - Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-2 de PCV2 das amostras em estudo.

Amostra	Posição do nucleotídeo	Substituição do nucleotídeo	Tipo de Substituição do nucleotídeo	Substituição do aminoácido
14	9	TAT <u>T</u> por TAC <u>C</u>	transição	-
2	59	G <u>G</u> C por G <u>C</u> C	transversão	G por A
12 e 15	147	CTC <u>C</u> por CT <u>A</u>	transversão	-
12 e 15	174	AA <u>G</u> por AA <u>A</u>	transição	-
163	175	<u>C</u> GA por <u>A</u> GA	transversão	-
62, 78 e 79	186	GTC <u>C</u> por GT <u>A</u>	transversão	-
62, 78 e 79	188	AA <u>A</u> por A <u>G</u> A	transição	K por R
12 e 15	204	G <u>C</u> G por G <u>C</u> A	transição	-
185	219	AG <u>A</u> por AG <u>G</u>	transição	-
2	327	T <u>C</u> C por TC <u>G</u>	transição	-
1, 2, 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 116, 118, 120, 177, 181, 185, 196, 199, 201 e 204	336	ACC <u>C</u> por AC <u>T</u>	transição	-
185	339	CAG <u>G</u> por CA <u>A</u>	transição	-
97, 98, 100, 116, 118 e 120	345	GAC <u>C</u> por GA <u>T</u>	transição	-
1, 2 e 4	420	CCC <u>C</u> por CC <u>G</u>	transversão	-
97, 98 e 120	546	CAG <u>G</u> por CA <u>A</u>	transição	-
2	561	CT <u>A</u> por CT <u>G</u>	transição	-
1, 2, 4, 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 116, 118, 120, 156, 157, 158, 162, 163, 177, 181, 185, 196, 199, 201 e 204	568	<u>G</u> CT por <u>A</u> CT	transição	A por T
177, 181, 185, 196, 199, 201 e 204	675	AA <u>T</u> por AA <u>C</u>	transição	-
12, 14, 15, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 116, 118, 120, 156, 157, 158, 162, 177, 181, 185, 196, 199, 201 e 204	699	CCC <u>C</u> por CC <u>T</u>	transição	-

Fonte: FERRARI, 2012.

4.6 GENOTIPAGEM DAS SEQUÊNCIAS DO PCV2

A análise filogenética das 27 sequências (22 genoma completo e cinco ORF-2 do PCV2) junto as sequências recuperadas do GenBank (item 4.3.1) foi realizada pela construção de três árvores filogenéticas, conforme detalhado a seguir:

(i) A primeira árvore filogenética apresenta a relação genealógica entre os 22 genomas completos (1, 2, 4, 12, 14, 15, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 157, 158, 162, 177, 181, 185, 196 e 204) de PCV2 do presente trabalho e as sequências recuperadas do GenBank (item 3.6.2.);

(ii) A segunda árvore filogenética apresenta a relação genealógica entre ORF-2 de PCV2 das 22 amostras sequenciadas completas e as sequências recuperadas do GenBank (item 3.6.2.).

(iii) A terceira árvore filogenética apresenta a relação genealógica da ORF-2 das 27 amostras (22 amostras sequenciadas completas e cinco parciais) e as sequências recuperadas do GenBank (item 3.6.2.).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo *Neighbor-Joining* e com *bootstrap* de 1000 repetições.

Figura 12 - Árvore filogenética i: análise das 22 sequências de PCV2 com genoma completo e sequencias obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). Os quadrados em cinza representam a localização das 22 sequências na árvore. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas).

13 - Árvore filogenética ii: análise da região ORF-2 das 22 e sequências obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). Os quadrados em cinza representam a localização das 22 sequências na árvore. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) .

Fonte: FERRARI, 2012

Figura 14 - Árvore filogenética iii: ORF-2 das 27 sequências de PCV2 e sequências obtidas pelo GenBank (item 3.6.2.). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*, modelo evolutivo Kimura 2 com os valores de *bootstrap* (1000 réplicas).

Fonte: FERRARI, 2012.

Na primeira árvore filogenética, as 22 sequências completas obtidas no estudo foram agrupadas num grande grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 97 %. Este grande, de acordo com a definição de Segalés et al. (2008), constitui o genótipo PCV2b.

Nesse grande grupo, as sequências obtidas das amostras 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118 e 120 formaram um subgrupo suportado por um valor de *bootstrap* de 67 %. Esse subgrupo ficou próximo às sequências da França (AY321991, AY321990, AY321995 e AY321996), Holanda (AY484415 e AY484409) e China (AY641542 e AY969004).

Além desse subgrupo, as sequências obtidas das amostras 204, 177, 181, 185 e 196 formaram outro subgrupo, e este ficou próximo a um subgrupo formado pelas amostras da França (AY321994, AY321999 e AY322001, AY322002).

As sequências das amostras 12 e 15 formaram um subgrupo junto às sequências da China (DQ141322, AY682993, AY391729, DQ017036, AY291316, DQ104420, AY849938, DQ104422 e AY686762), Áustria (AY424405) e Holanda (AY484414).

As sequências 1, 4, 157, 158 e 162 formaram um subgrupo junto às sequências da China e Holanda (AY682992 e AY484407), suportadas por um valor de *bootstrap* de 51 %, enquanto que a amostra 2 ficou isolada, não formando subgrupo.

A segunda árvore filogenética que foi montada com as ORFs-2 das 22 amostras, que tiveram o genoma de PCV2 sequenciado por completo, formou um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 99 %. O agrupamento foi igual ao obtido na primeira árvore montada com as sequências completas, mantendo a classificação das amostras no genótipo PCV2b pela classificação de Segalés et al. (2008).

Entretanto, apesar de inseridas no mesmo grupo, as sequências não situaram-se nas mesmas posições. As amostras 12 e 15 formaram um subgrupo junto a sequência do Brasil (EU057185).

As demais sequências (1, 2, 4, 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 157, 158, 162, 177, 181, 185, 196 e 204) formaram um subgrupo junto às sequências da China (AY391729 e AY969004) e Holanda (AY484409).

A terceira árvore filogenética foi montada com as 27 ORFs-2, sendo 22 das amostras que tiveram o PCV2 sequenciado por completo e cinco parcial. Assim como observado anteriormente, as sequências se agruparam junto com as do genótipo PCV2b (SEGALÉS et al., 2008). Interessantemente, os subgrupos mantiveram-se os mesmos observados na segunda árvore filogenética.

5 DISCUSSÃO

Circovírus suíno (PCVs) são pequenos vírus não envelopados com DNA circular de fita simples pertencente à família *Circoviridae* (ALLAN e ELLIS, 2000). PCVs são classificados em duas espécies, circovírus suíno 1 (PCV1), não patogênico, e circovírus suíno 2 (PCV2) aceito como essencial agente infeccioso para o desenvolvimento da doença sistêmica (antiga PMWS) e associado a outras doenças como dermatite e nefropatia suína (PDNS) (SMITH, 1993), distúrbios reprodutivos (WEST et al., 1999; O'CONNOR, 2001), enterite (JENSEN et al., 2006) e doença do complexo respiratório suíno (PRDC) (HARMS et al., 2001).

A PRDC acarreta severo prejuízo econômico (STARK, 2000; VAN REETH; NAUWYNCK, 2000; KICH; PONTES, 2001). Nos abatedouros, perdas consideráveis podem ser observadas pelas condenações relacionadas com pneumonias, pleurites e/ou abscessos (BARCELLOS, 2008) e devido a alterações macroscópicas (KICH; PONTES, 2001).

Comparado a outros patógenos virais, a presença consistente do PCV2 nas lesões em pulmão indicam que o PCV2 poderia desenvolver um papel importante no desenvolvimento da PRDC (KIM et al., 2005).

A detecção de PCV2 em lesões de PCVAD pode ser realizada por diferentes métodos diagnósticos, dentre eles a hibridização *in situ*, imunohistoquímica e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (ALLAN; ELLIS, 2000).

A PCR tem sido utilizada a campo no diagnóstico de doenças suínas nos últimos anos, para detecção de patógenos como vírus, bactérias, mycoplasmas ou parasitas em espécimes patológicas ou clínicas (THONSON et al., 2000).

No presente estudo, do total de 200 amostras de pulmão, 88,5 % (177/200) foram positivas e 11,5 % (23/200) foram negativas para PCV2 pela PCR. Esse grande numero de amostras de pulmão positivas para PCV2 corroboram com estudos anteriores em que o PCV2 foi detectado através de técnicas como imunoistoquímica (SZEREDI; SZENTIRMAI, 2008), hibridização *in situ* (KIM et al., 2003) e PCR (GRAU-ROMA; SEGALÉS, 2007) e indicam que possa ter importante papel dentro da PRCD.

Entretanto, das 177 amostras positivas para PCV2, 91 amostras apresentavam lesões pneumônicas macroscópicas e 86 não apresentavam lesões em pulmão. Não houve associação, significativa, entre a positividade da PCR e presença ou ausência de lesões pneumônicas macroscópicas ($p=0,26$).

Estes resultados foram relatados em estudos anteriores com amostras brasileiras em que, o vírus foi detectado em suínos com ausência ou presença de uma variedade de lesões e sinais clínicos inseridos na terminologia PCVAD (CASTRO et al. 2007).

Sanches et al. (2006) sugerem que animais positivos para PCV2, porém sem lesão, poderiam estar no estágio inicial da infecção.

Considerando a distribuição das amostras positivas para PCV2, sendo 40 oriundas de Holambra, 37 de Óleo, 37 de Espírito Santo do Pinhal, 36 de Itú e 27 de Fartura, os dados indicam, ainda, que as propriedades de onde vêm os animais utilizam medidas de controle que minimizam a ocorrência de surtos da doença como os “20 pontos de Madec”, uma vez que os animais abatidos estavam clinicamente saudáveis (MADEC et al. 2008).

Em estudo de caso-controle realizado na Dinamarca, os autores concluíram que, apesar de subclínico, o PCV2 poderia abrir caminho para outros patógenos respiratórios ou ocorrer como patógeno secundário (GILLESPIE et al., 2009).

Em suínos experimentalmente infectados com PCV2 que não desenvolveram a doença clínica, anticorpos neutralizantes capsideo-específicos foram detectados no período de 10 à 28 dias após a inoculação. O aparecimento de anticorpos neutralizantes no soro coincidiu com a diminuição da carga viral no soro. No entanto, em suínos clinicamente doentes, o nível de anticorpos neutralizantes foi significativamente menor, levando ao desencadeamento do PCVAD (MEERTS et al., 2006; FORT et al., 2007).

A introdução de vacinas para PCV2 a partir do ano de 2007 (OPRIESSNIG et al., 2007; NATHAN, 2012), também, pode ter interferido nos resultados obtidos considerando que, o menor número de amostras PCV2 positivas, foram de animais vacinados oriundos da cidade de Fartura.

Além disso, nos animais com PRDC que manifestam um quadro de pneumonia, frequentemente, existe co-infecção entre agentes bacterianos e virais (KEKARAINEN, et al., 2006; ELLIS et al., 2008).

Em trabalho de infecção experimental, *Mycoplasma hyopneumoniae* em associação com PCV2 produziu pneumonia mais severa e aumento da incidência da doença sistêmica, enquanto que, os animais infectados apenas com PCV2, não houve o desenvolvimento da doença (OPRESSNIG et al., 2004).

Presença prolongada do antígeno de PCV2 em tecido linfóide e pulmão, assim como, aumento da frequência respiratória, letargia, tosse e espirro também foram relatados (OPRESSNIG et al., 2004).

O vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) junto ao PCV2 inoculados em animais derivados de cesárea e privados de colostro induziu a doença clínica severa, alta mortalidade e lesões compatíveis à doença sistêmica, incluindo pneumonia intersticial severa e depleção linfóide (HARMS et al., 2001).

Recentemente, o *Torque teno sus virus* (TTV1 e TTV2) foi descrito como potencializador do aparecimento dos sinais clínicos da PCVAD e o TTV1 em associação com PCV2 produziu pneumonia intersticial em leitões gnotobióticos experimentalmente infectados (KEKARAINEN, et al., 2006; ELLIS et al., 2008).

Evidências a campo, também, mostram que o desenvolvimento de PCVAD, como manifestação respiratória, é multifatorial e nem todo suíno infectado pelo PCV2 irá desenvolver a doença clínica (OPRESSNIG et al., 2007).

Palzer et al. (2012) analisaram fluidos bronqueoalveolar oriundos de animais com ausência e presença de sinais clínicos de pneumonia para diversos patógenos respiratórios. PCV2 foi o patógeno mais frequente isolado pela *multiplex*-PCR. Os autores concluíram que PCV2 é prevalente em suínos e não há diferença significativa entre positividade e animais com ausência e presença de sinais clínicos.

Em outro estudo, a investigação entre patologia e os principais patógenos associados à PRDC foi realizado por Hansen et al. (2010). Os autores demonstraram, entre as

combinações mais frequentes vista, apenas no grupo controle, a presença do PCV2 sozinho ou associado a outros patógenos.

A patogenicidade do PCV2, observada em surtos, e a detecção do agente em animais com ausência de sinais clínicos (SEGALÉS e DOMINGO, 2002), fez estudos relacionados à diversidade genética e à patogenicidade, tenham sido realizados e direcionados principalmente à ORF-2 (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; FENAUX et al., 2004; JEMERŠIĆ et al., 2004; OLVERA et al., 2007).

A ORF-2 é responsável por codificar a proteína estrutural do capsídeo e, sendo esta a proteína mais variável, tem a capacidade de se ligar ao receptor da célula hospedeira (SHANG et al., 2009).

O capsídeo do PCV2 é a principal proteína imunogênica (MAHÉ et al., 2000) e, assim, tem sido o alvo para o desenvolvimento de vacinas e ensaios sorológicos para rastrear respostas imunes PCV2-específicas (NAWAGITGUL et al., 2002; SUN et al., 2010; PATTERSON et al., 2011; HUANG et al., 2011).

Além disso, estudo realizado por Olvera et al. (2007) permitiu a definição dos genótipos de PCV2 por diferentes métodos de construção de árvores filogenéticas com o genoma completo do vírus e apenas o gene *Cap*.

Os autores reportaram que o gene *Cap* está sob menor pressão seletiva comparado ao gene *Rep*, acumulando maior variabilidade e isso, provavelmente, pesa mais na construção de árvores filogenéticas. Os efeitos de recombinação parecem ser limitados à primeira região do gene *Rep*, tendo pequeno impacto da reconstrução de árvores filogenéticas junto ao gene *Cap* (OLVERA et al., 2007).

Desta forma, o gene *Cap* torna-se um marcador epidemiológico e filogenético nos estudos, uma vez que, sendo menor, torna-se menos laborioso para sequenciar que o genoma completo (OLVERA et al., 2007).

Atualmente, três genótipos diferentes de PCV2 são reconhecidos: PCV2a, PCV2b e PCV2c (SEGALÉS et al., 2008; DUPONT et al., 2008; CORTEY et al., 2011;).

Os PCV2a e -b foram ambos associados a PCVAD clínica com diferentes graus de severidade (ALLAN et al., 2007; AN et al., 2007; MADSON et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2008; CIACCI-ZANELLA, et al., 2009), enquanto que o PCV2c foi relatado somente em animais clinicamente saudáveis presentes em amostras arquivadas na Dinamarca (DUPONT et al., 2008).

Do total de 177 amostras PCV2 positivas deste estudo, 22 sequências completas (1767 nt) e cinco sequências da ORF-2 (699 nt) de PCV2 foram obtidas, respectivamente.

O valor de identidade mínima de nucleotídeos entre as 22 sequências com genoma completo variaram entre 97,5 % (ORF-1) e 98,1 % (ORF-2) e máxima de 100 % (ORF-1 e ORF-2).

Já entre a ORF-2 dos 27 isolados (22 genoma completo e cinco ORF-2) a identidade nucleotídica variou entre 98,1 % à 100 %

A alta identidade mínima entre as 27 sequências do presente estudo, obtidas de diferentes animais, poderia ser explicada pela transmissão horizontal do PCV2 de um animal para outro dentro das granjas positivas para o vírus (GRAU-ROMA et al., 2008).

Considerando, também, a evolução do vírus pela ocorrência de mutação e recombinações, o gene *Cap* poderia estar sob pressão seletiva positiva, explicando, assim, a baixa variabilidade entre as sequências de PCV2 (OLVERA et al., 2007; GRAU-ROMA et al., 2008; PÉREZ et al., 2011).

A distância geográfica entre as granjas coletadas e, provavelmente, ausência de movimentação desses animais dentro dessas áreas, ainda demonstram que eventos de recombinação dessas sequências, promoveriam grande diversidade de PCV2 (PÉREZ et al., 2011).

Larochelle et al. (2002) analisaram 34 sequências completas de PCV2 e identificaram três grandes regiões de heterogeneidade nos aminoácidos da ORF-2 (59–80, 121–136 e 180–191) pelos quais, duas destas regiões corresponderam a dois dos domínios antigênicos (65-87, 113-139) descritos por Mahé et al. (2000).

Três regiões diferentes com grande heterogeneidade (57-91, 121-136, 185-191) também foram observados por Grau-Roma et al. (2008), revelando a existência de padrões específicos para cada genótipo de PCV2. As sequências de PCV2a isoladas pelo autor, apresentaram 15 substituições enquanto que, nas sequências selecionadas do genótipo PCV2b, essas áreas apresentaram-se altamente conservadas. Dessas 15 substituições, oito apresentaram-se na região de heterogeneidade 57-91.

Em adição, AN et al. (2007) diferencia os genótipos em posições específicas nas sequências dos nucleotídeos (262 - 267nt) e aminoácidos (88 - 89aa) da região ORF-2, onde PCV2b apresenta as sequências nucleotídicas CCCCCG ou CCCCTC, codificando para prolina e arginina (PR) ou prolina e leucina (PL), e PCV2a apresenta a sequência nucleotídica AAAATC codificando para lisina e isoleucina (KI).

O alinhamento da ORF-2 das 27 sequências, ainda, demonstraram mutações nucleotídicas que resultaram em substituições nos aminoácidos, localizados nos córdons 20, 63 e 190. Duas áreas de substituições nos aminoácidos, correspondem às duas áreas de heterogeneidade descritas por Larochelle et al. (2002) e Grau-Roma et al. (2008) e a uma região de domínio antigênico descrito por Mahé et al. (2000).

Larochelle et al., apontou como possíveis implicações dessas áreas de heterogeneidade na proteína do capsídeo, como potenciais candidatos envolvidos na emergência de variantes do PCV2 (LAROCHELLE et al., 2002).

Assim como no trabalho de AN et al. (2007), mutações localizadas entre os códon 262-267 e aminoácidos 88-89 (CCCCGC), que codificam para prolina e arginina (PR) foram encontrados nas 27 sequências.

O alinhamento das 27 sequências permitiu classifica-las como pertencentes ao genótipo PCV2b (SEGALÉS et al., 2008).

Quando comparadas às sequências dos trabalhos de Olvera et al. (2007), Ciacci-Zanella et al (2009) e as de referência de PCV2a, -b e -c (SEAGALÉS et al., 2008) recuperadas do GenBank, tanto as 22 sequências (genoma completo), como as cinco sequências (ORF-2) mostraram-se muito semelhantes às de outros países, com uma identidade nucleotídica mínima variando entre 89,6% (sequência oriunda da Dinamarca) e 99,8%

(sequências oriundas da Áustria, China, França e Holanda); e a identidade de aminoácidos variando entre 84,5% (duas sequências de PCV2c da Dinamarca) e 99,6% (sequências da China).

As identidades nucleotídicas e de aminoácidos mais baixas reportadas no presente estudo, em relação às amostras do GenBank, foram junto as amostras da Dinamarca (EU148503, EU148504 e EU148505) pertencentes ao genótipo PCV2c. Essa diferença poderia ser explicada pela idade dos PCV2 envolvidos uma vez que, maior variabilidade foi encontrada dentro do genótipo PCV2a utilizando sequências disponíveis do NCBI/GenBank antes de 2005, sugerindo que este genótipo seria mais antigo que –b (GRAU-ROMA et al., 2008; CARMAM et al., 2006).

Desta forma o PCV2c retirado de amostras arquivadas da década de 80 poderia apresentar maior variabilidade em relação as amostras de PCV2b deste trabalho e portanto, menor homologia entre os isolados.

Entretanto, em estudo realizado por Dupont et al. (2008), PCV2c mostrou maior identidade nucleotídica com o PCV2b (cerca de 95%) do que em relação ao PCV2a (91-93,6%). De acordo com os autores, a razão para isto é desconhecida, mas seria mais viável indicar a introdução de novas estirpes nas criações dinamarquesas com o tempo do que a mutação de estirpes existentes.

Em adição, a análise filogenética foi realizada com o genoma completo e somente com ORF-2 das 22 sequências isoladas. A topologia geral da árvore formada com o gene *Cap* (ORF-2) foi semelhante àquela obtida com o genoma completo e em ambas, as sequências foram agrupadas dentro do genótipo PCV2b.

Este genótipo foi descrito em diferentes estudos, porém, utilizando outras nomenclaturas: grupo ‘1’ (GRAU-ROMA et al., 2008), ‘1’ subdividido em três grupos (1A-1C) (OLVERA et al., 2007), ‘I’ (BOISSÉSON et al., 2004), ‘SG3’ (TIMMUSK et al., 2008), ‘A’ (CASTRO et al., 2007), e fragmentos polimórficos de restrição ‘321’ (CARMAN et al., 2008).

Desta forma, a distinção entre os genótipos de PCV2 pela utilização apenas da região ORF-2 foram confirmados neste estudo, corroborando com trabalhos descritos anteriormente (CHEUNG et al. 2007; OLVERA et al., 2007).

Entretanto na árvore filogenética formada apenas com região ORF-2, a acurácia para diferenciar as linhagens entre sequências do mesmo genótipo, torna-se reduzida em relação à árvore formada com o genoma completo.

Na primeira árvore, as sequências 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118 e 120, que se apresentaram próximas às sequência da França, China e Holanda, as sequências 204, 177, 181, 185 e 196, que se apresentaram próximas às sequências da França, e ainda as sequências 1, 4, 157, 158 e 162 que formaram um subgrupo junto as sequências da China e Holanda, na segunda árvore filogenética, formaram um único subgrupo junto apenas das sequências da China e Holanda.

De acordo com a nomenclatura sugerida por Olvera et al. (2007) as sequências 14, 62, 78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 177, 181, 185, 196 e 204 pertenceriam ao subgrupo 1A e as sequências 1, 4, 157, 158 e 162 ao grupo 1B pelo uso do genoma completo. Entretanto, com apenas a ORF-2, todos pertenceriam ao grupo 1A.

Desta forma, apesar da ORF-2 exibir maior variação nucleotídica comparado à ORF-1 (LAROCHELLE et al., 2002), o presente estudo corrobora com AN et al. (2007) em que ORF-1 representaria a “chave” para distinção entre os subgrupos 1A e 1B, e portanto, permitiria identificar maior variabilidade genética entre os genótipos de PCV2.

Além disso, Olvera et al. (2007) descrevem o grupo 1B como, provavelmente, o produto da recombinação entre grupo 1 e 2 (PCV2a e -b) e a região com maior recombinação para este subtipo estaria presente dentro da ORF-1.

A terceira árvore filogenética formada com a ORF-2 das 22 sequências (genoma completo) e das cinco sequências (ORF-2) do presente estudo junto às sequências recuperadas do GenBank (item 3.6.2.) apresentaram resultados similares a segunda árvore filogenética formada com ORF-2.

Os cinco isolados (116, 156, 163, 199 e 201) também foram classificados como pertencentes ao genótipo PCV2b e formaram um subgrupo junto aos isolados 1, 2, 4, 14, 62,

78, 79, 97, 98, 100, 118, 120, 157, 158, 162, 163, 177, 181, 185, 196, 204 e sequências da China e Holanda como descritos na segunda árvore.

Com exceção do PCV2c, o alto valor de identidade e proximidade filogenética apresentado entre, principalmente, as sequências provenientes da China, França, Hungria, Holanda e Brasil com variados sinais clínicos, e as sequências do presente estudo, confirmam os achados de Larochelle et al. (2002) sobre a alta homologia nucleotídica e presença de diferenças mínimas entre genomas de PCV2 isolados de diferentes quadros clínicos.

Os autores especularam que as regiões imunodominantes da proteína *Cap* expostas a pressões seletivas imunológicas poderiam representar potenciais candidatos envolvidos na emergência de variantes PCV2.

No entanto, não houve aminoácidos característicos que apontassem diferenças entre as 27 sequências da ORF-2 do presente estudo, obtidas de animais subclínicos, e sequências obtidas pelo GenBank, oriundas de animais apresentando outras condições clínicas (LAROCHELLE et al., 2002).

Os resultados, ainda, corroboram com trabalhos realizados em diversos países em que sequências de PCV2 oriundas de animais saudáveis (ausência de sinais clínicos) e com PCVAD foram analisadas, e nenhuma relação entre as mutações observadas nas sequências da ORF-2 do PCV2 e ocorrência da doença foi observada (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; BOISSESON et al., 2004; JEMERŠIĆ et al., 2004; CASTRO et al., 2007; OLVERA et al., 2007; BARCELLOS et al., 2009).

A predominância do genótipo PCV2b identificado nas amostras de pulmão, nos levam a sugerir que possa ser predominante em populações de suínos das regiões coletadas.

Os resultados corroboram com estudos anteriores (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; JEMERŠIĆ et al., 2004; CASTRO et al., 2007; OLVERA et al., 2007; DUPONT et al., 2008; BARCELLOS et al., 2009) em que os autores relatam maior frequência de PCV2b em relação ao -a.

Contudo, considerando que as sequências de PCV2 são provenientes de animais com ausência de sinais clínicos, não há concordância com os trabalhos realizados na América do Norte e Europa em que, o subtipo PCV2b foi associado ao aumento das lesões e ocorrência de

PCVAD (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008; TIMMUSK et al., 2008 ; CORTEY et al., 2010)

A explicação para a predominância do PCV2b nas populações de suínos está na troca do genótipo a para o b que teria ocorrido próximo ao ano de 2003 (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; CARMAN et al., 2008; DUPONT et al., 2008; CIACCI ZANELLA, et al., 2009; CHAE; CHOI, 2010; CORTEY et al., 2011)

Coincidentemente, o PCV2b quando comparado ao –a, foi detectado com maior frequência durante surtos da doença sistêmica em suínos da América do Norte (GAGNON et al., 2007).

Desta forma o genótipo PCV2b foi associado a um aumento da gravidade clínica de PCVAD (CHEUNG et al., 2007; GAGNON et al., 2007; DUPONT et al., 2008; TIMMUSK et al., 2008 ; CORTEY et al., 2010; SZEREDI, 2011).

Entretanto, os estudos acerca do PCV2b foram realizados após a introdução de vacinas. Desta forma, uma vez que as maiores diferenças nucleotídicas encontradas entre os genótipos foram na proteína do Capsídeo (OLVERA et al., 2007), especula-se que o PCV2a seja mais antigo e que o PCV2b poderia estar mais adaptado e ser mais eficaz para anexar e entrar na célula (DUPONT et al., 2008), diminuindo a eficácia da vacina.

No entanto, vacinas atuais baseadas no genótipo PCV2a demonstraram conferir imunidade através de proteção-cruzada contra PCV2b (OPRIESSNIG et al., 2009; SEGALLES et al., 2009).

Apesar do gene *Cap* ter sido, inicialmente, associado a patogenicidade (HAMEL et al., 1998; FENAUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; JEMERŠIĆ et al., 2004; OLVERA et al., 2007), estudos recentes de Liu et al (2006) demonstraram que apoptose induzida pela ORF-3 está associada a patogenicidade viral do PCV2. Esses achados foram, posteriormente descritos, também por Karuppannan et al. (2009).

Portanto, os resultados do presente estudo, em que não houve relação entre diversidade genética da ORF-2 e sinais clínicos, colaboram com os estudos que demonstram que outra região, que não seja a ORF-2, esteja relacionada com a patogenicidade.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na detecção de PCV2 através de PCR, apesar do grande numero de amostras positivas, não foi possível inferir a associação entre amostras de pulmão com lesão pneumônicas macroscópicas e presença do PCV2 ($p=26$).

Com base no sequenciamento das 22 sequências de genoma completo e 5 sequências com ORF-2 do PCV2, observou-se a predominância do genótipo PCV2b nas granjas de suínos oriundas do Estado de São Paulo, tanto através da análise filogenética.

A alta homologia nucleotídica entre as amostras isoladas do presente estudo e às amostras recuperadas do GenBank, confirmam os achados de Larochelle et al. (2002) em que não houve mudanças características nas sequências que apontassem diferenças entre os PCV2 e condições clínicas diversas.

7 REFERÊNCIAS

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Carne suína Brasileira, 2011**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 20 de abril de 2011.
- ALLAN, G. M.; ELLIS J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 12, p. 3 - 4, 2000.
- ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 10, p. 3 - 10, 1998.
- ALLAN, G. M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J. C.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S. J.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1 - 11, 1999.
- ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine Biology**, v. 41, p. 17 - 26, 1994.
- AN, J. N.; ROHA, I.; SONG, D.; PARK, C.; PARK, B. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. **Vírus Research**, v. 129, p. 115 - 122, 2007.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; GHELLER, N. B.; MÔNICA SANTI, M.; MORES, T. J. Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p.87- 93, 2008. Suplemento
- BARCELLOS, D. E.; COELHO, C. F.; HERNING, L. F. Experiência brasileira no controle da infecção por PCV2. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2009, Uberlândia. Anais...v. 14, p. 183 – 189.
- BOISSESON, C. D.; BEVEN, V.; BIGARRE, L.; THIERY, R.; ROSE, N.; EVENO, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 293 - 304, 2004.
- BLANCHARD, P.; MAHÉ, D.; CARIOLET, R.; TRUONG, C.; LE DIMNA, M.; ARNAULD, C.; ROSE, N.; EVENO, E.; ALBINA, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. An ORF-2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 183 - 194, 2003.
- BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 171 - 178, 2004.

CARMAN, S.; CAI, H. Y.; DELAY, J.; YOUSSEF, S. A.; MCEWEN, B. J.; GAGNON, C. A.; TREMBLAY, D.; HAZLETT, M.; LUSIS, P.; FAIRLES, J.; ALEXANDER, H. S.; VAN DREUMEL, T. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 259 - 268, 2006

CASTRO, A. M. M. G. **Caracterização genética de amostras brasileiras de circovírus suíno tipo 2 (PCV-2-2)**. 2005. 120f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; Heinemann, M. B.; Brandão, P. E.; Richtzenhain, L. J. Genetic diversity of brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). **Archives of Virology**, v. 152, n.8, p. 1435 - 1445, 2007.

CASTRO, A. M. M. G.; CRUZ, T. F.; SALGADO, V. R.; KANASHIRO, T. M.; FERRARI, K. L.; ARAÚJO, Jr. J. P.; BRANDÃO, P.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of porcine circovírus genotypes 2a and 2b in aborted fetuses from infected swine herds in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 1 - 9, 2012.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N., Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine circovírus type 2 (PCV2). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 522 - 527, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1480 - 1485, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; SIMON, N. L.; PINTO, L. S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L. T. HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O. A.; ESTEVES, P. A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 157 - 160, 2009.

CORTEY, M; PILERI, E; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; BALASCH, M.; PLANA, J.; SEGALÉS, J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. **The Veterinary Journal**, p. 1 - 6, 2010.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 41 - 49, 2004.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2 - associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 326 - 336, 2005.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, v.168, p.41- 49, 2004.

CHEUNG, A. K. Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9016 - 9029, 2004.

CHEUNG, A. K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 305, p. 168 - 180, 2003.

CHEUNG, A. K.; LAGER, K. M.; KOHUTYUK O. I.; VINCENT, A. L.; HENRY, S. C.; BAKER, R. B.; ROWLAND, R. R.; DUNHAM, A. G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Archives of Virology**, v. 152, p. 1035 - 1044, 2007.

DAFT, B.; NORDHAUSEN R.W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. **Proceedings -American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v. 39, p. 32, 1996.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEUM, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: An immune riddle. **Archives of Virology**, v. 149, p. 857 - 874, 2004.

DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BAKBO, P.; LARSEN, L. E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 56 - 64, 2008.

DURAN, C. O.; RAMOS-VARA, J.; RENDER J. A. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discolouration in swine. **Swine Health Production**, v. 5, n. 6, p. 241 - 244, 1997.

ELLIS, J. A. et al. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2- associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1608 - 1614, 2008.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J. C. S.; ALLAN, G. M.; WILSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B. M.; TODD, D.; HAINES, D. M. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 44 - 51, 1998.

FARAH, S. B. **DNA: segredos e mistérios**. São Paulo: Savier, 1997.

FARNHAM, M. D. W.; CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 108 - 113, 2003.

FENAUX, M.; HALBUR, P. G.; GILL, M.; TOTH, T. E. MENG, X. J. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2494 - 2503, 2000.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G.; ELVINGER, F.; MENG, X. J. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV Type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces

protective immunity against PCV2 infection in pigs. **Journal of Virology**, p. 6297 - 6303, 2004.

FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circoviruses - small but powerful. **Virus Research**, v. 143, p.177 - 183, 2009.

FORT, M.; FERNANDES, L. T.; NOFRARIAS, M.; DÍAZ, I.; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; MATEU, E.; SEGALÉS, J. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. **Veterinary Immunity Immunopathology**, v. 129, p. 101–107, 2009.

FORT, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 3 - 4, 2007

FRANÇA, T. N.; RIBEIRO, C. T.; CUNHA, B. M.; PEIXOTO, P. V. Circovirose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 59 - 72, 2005.

GAGNON C. A. et al. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV2b) in swine in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 811 - 819, 2007.

GAGNON, C. A.; MUSIC, N.; FONTAINE, G.; TREMBLAY, D.; HAREL, J. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 1 - 6, 2010.

GAGNON, C. A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P.; VENNE, M. H.; HOUDE, A.; ELAHI, S. M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 811 - 819, 2007.

GAUGER, P. C.; LAGER, K. M.; VINCENT, A. L.; OPRIESSNIG, T.; KEHRLI, J. R. M. E.; CHEUNG, A. K. Postweaning multisystemic wasting syndrome produced in gnotobiotic pigs following exposure to various amounts of porcine circovirus type 2a or type 2b. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 229 - 239, 2011

GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. **Journal Veterinary International Medicine**, v. 23, p. 1151 - 1163, 2009.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 23 - 35, 2008.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 23 – 32, 2011.

GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus

in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 144 - 151, 2007.

GRIERSON, S. S.; KING, D. P.; WELLENBERG, G. J.; BANKS, M. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Research in Veterinary Science*, v. 77, p. 265 - 268, 2004.

GUTEIRREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and molecular life sciences**, v. 56, p. 313 - 329, 1999.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**. v. 72, p. 5262 - 5267, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95 - 98, 1999.

HANSEN, M. S.; HJULSAGER, C. K.; BILLE-HANSEN, V.; HAUGEGAARD S.; DUPONT, K.; HOGEDAL, P.; KUNSTMANN, L.; LARSEN, L. E. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 203 - 209, 2010a.

HANSEN, M. S.; PORTS, S. E.; JENSEN, H. E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E. M.; NIELSEN, O. L. An investigation of pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, p. 1 - 12, 2010b.

HARDING, J.; CLARK, E. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health and Production*, v. 5, p. 201 - 203, 1997.

HARDING, J. C. S.; CLARK, E. G.; STROKAPPE, J. H.; WILLSON, P. I.; ELLIS, J. A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. **Journal of Swine Health and Production**, v. 6, p. 249 - 254, 1998.

HARDING, J. C. S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 131 - 135, 2004.

HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; BOLIN, S. R.; BOLIN, S. R.; LAGER, K. M.; MOROZOV, I., PAUL, P. S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v. 38, p.528 - 539, 2001.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1863 - 1868, 2004.

HUI, R. K. H.; ZENG, F.; CHAN, C. M. N.; YUEN, K. Y., PEIRIS, J. S. M.; LEUNG, F. C. C. Reverse transcriptase PCR diagnostic assay for the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1994 - 1999, 2004.

JEMERSIC, L.; CYENTNIC, Z.; TOPLAK, I.; SPICIC, S.; GROM, J.; BARLIC-MAGANJA, D.; TERZIC, S.; HOSTNIK, P.; LOJKIC, M.; HUMSKI, A.; HABRUN, B.; KRT, B. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from Croatia. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 171 - 175, 2004.

JENSEN T. K.; VIGRE H.; SVENSMARK B.; BILLE-HANSEN V. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 176 - 182, 2006.

KARUPPANNAN, A. K.; JONG, M. H.; LEE, S. H.; ZHU, Y.; SELVARAJ, M.; LAU, J.; JIA, Q.; KWANG, J. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. **Virology**, v. 383, p. 338 - 347, 2009.

KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS) - affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 833 - 837, 2006.

KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. M. Reproduction of Lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 9 - 24, 2000.

KICH, J. D.; PONTES, A. P. Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, n., Porto Alegre, 2001. **Anais...** v. 1, p. 58 - 67, 2001.

KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, p. 251 - 256, 2003a.

KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; CHAE, C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 218 - 221, 2003b.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MCNEILLY, F.; RINGLER, S.; RINGS, D. M.; ALLAN, G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting syndrome disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 31 - 42, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p. 1244 - 1245, 2004.

LAINSON, F. A.; AITCHISON, K. D.; DONACHIE, W.; THOMSON, J. R. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 588 - 593, 2002.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. **Virus Research**, v. 90, p. 101 - 112, 2002.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 67, p. 114 - 120, 2003.

LECANN, P.; ALBINA, E.; MADEC, F.; CARIOLET, R. e JESTIN, A. Piglet wasting disease. **Veterinary Record**, v.141, p. 660, 1997.

LIU, J.; CHEN, I; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, 5065 - 5073, 2006.

MCKEOWN, N. E.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS, P.; GUENETTE, D. K.; ELVINGER, F.; FENAUX, M.; HALBUR, P. G.; MENG, X. J. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, p. 1347 - 1351, 2005.

MADSON, D. M.; OPRIESSNIG, T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, p. 47 - 65, 2011.

MADSON, D. M.; PATTERSON, A. R; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X. J.; OPRIESSNIG, T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Veterinary. Pathology*, v. 4, n.4, p. 707 - 716, 2009a.

MADSON, D. M.; RAMAMOORTHY, S.; KUSTER, C.; PAL, N.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally infected boars. *Veterinary. Research*, v. 40, n. 1, p. 10, 2009b.

MADEC, F.; ROSE, N.; GRASLAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, p. 273 - 283, 2008.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTÍNEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 454 - 456, 2005.

MANKERTZ, A.; DOMINGO, M.; FOLCH, J.M.; LECANN, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; CHMIELEWICZ, B.; PLANA-DURAN, J.; SOIKE, D. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. **Virus Research**, v. 66, p. 65 - 77, 2000.

MANKERTZ, A.; ÇALISKAN, R.; HATTERMANN, K.; HILLENBRAND, B.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; SCHMITT, C.; STEINFELDT, T.; FINSTENBUSCH, T. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 81 - 88, 2004.

MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G.; BUHK, H. J. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 2562 - 2566, 1997.

MAHÉ, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C.; ARNAULD, C.; LE CANN, P.; CARIOLET, R.; MADEC, F.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*, v. 81, p.1815 - 1824, 2000.

MENG, X. J., Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transboundary and emerging diseases*. v. 59, p. 85 - 102, 2012.

MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.; NIELSEN, J.; BOTNER, A.; KRISTENSEN, C. S.; NAUWYNCK, H. J. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. **Biomedical Veterinary Research**, v. 2, p. 6, 2006.

MIKAMI, O.; NAKAJIMA, H.; KAWASHIMA, K.; et al. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 67, p.735 - 738, 2005.

MISINZO, G.; DELPUTTE, P.L.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D. J.; NAUWYNCK, H. J. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. **Journal of Virology**, v. 80, p. 3487– 3494, 2006.

MORIN,M.; GIRARD,C.; ELAZHARY, Y.; FAJARDO, R.; DROLET, R.; LAGACE, A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 837 - 839, 1990.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P. A.; MOROZOV, I.; THACKER, B. J.; SORDEN, S. D.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P. S. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type-2-based and recombinant capsid protein (ORF-2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 33 - 40, 2002.

BEACH, N. M.; MENG, X. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, p. 33 - 42, 2012.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGELÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. **Virology**, v. 357, p. 175 - 185, 2007.

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **Journal of Virology Method**, v. 117, p. 75 - 80, 2004.

OPEL, K. L.; CHUNG, D.; MCCORD, B. A Study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, p. 25 - 33, 2010.

OPRIESSNIG, T.; FENAUX, M.; YU, S.; EVANS, R. B.; CAVANAUGH, D.; GALLUP, J. M.; PALLARES, F. J.; THACKER, E. L.; LAGER, K. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early

weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 209 - 220, 2004a.

OPRIESSNIG, T.; GIMENEZ-LIROLA L. G.; HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12; p. 133 - 148, 2011.

OPRIESSNIG, T.; THACKER, E. L.; YU, S. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 624 - 640, 2004b.

OPRIESSNIG, T.; MADSON, D. M.; PRICKETT, J. R.; KUHAR, D.; LUNNEY, J. K.; ELSENER, J.; HALBUR, P. G. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 103 - 114, 2008.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p. 591 - 615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; MADSON, D.M.; PAL, N.; HALBUR, P. G. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. **Vaccine**, v. 27, p. 1002 - 1007, 2009.

PAIXÃO, R. L. É possível garantir bem-estar aos animais de produção? **Revista CRMV – Brasília/ DF**, v. 11, n. 36, p. 70, 2005.

PALZER, A.; RITZMANN, M.; WOLF, G.; HEINRITZI, K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. **Veterinary Record**, v. 162, p. 267-271, 2008.

PÉREZ, L. J.; ARCE, H. D.; CORTEY, M.; PERCEDO, P. D. M. I.; PERERA, C. L.; TARRADAS, J.; FRÍAS, M. T.; SEGALÉS, J.; GANGES, L.; NÚÑEZ, J. I. Phylogenetic networks to study the origin and evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Cuba. **Veterinary Microbiology**, v. 151, p. 245 - 254, 2011.

PESCADOR, C. A.; BANDARRA, P. M.; CASTRO, L. A.; ANTONIASSI, N. A. B.; RAVAZZOLO, A. P.; SONNE, L.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 425 - 429, 2007.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALÉS, J.; BALASCH, M.; ROSELL, C.; QUINTANT, J.; FOLCH, J. M.; PLANA-DURAN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. **Veterinary Record**, v. 146, n. 26, p. 762 - 764, 2000.

ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURAN, J.; ROSELL, C.; ELLERBROCK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. **Journal Virology**, v.76, p. 3232 - 3239, 2002.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal Comparative Pathology**, v. 120, p. 59 - 78, 1999.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J. A.; FOLCH, J. M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; DURAN, C. O.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v. 146, p. 40 - 43, 2000.

ROSENSTRAUS, M.; WANG, Z.; CHANG, S.Y.; DEBONVILLE, D.; SPADORO, J. P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 191 - 197, 1998.

ROYER, R. L.; NAWAGITGUL, P.; HALBUR, P. G.; PAUL, P. S. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of swine health and production*, n. 9, v.6, p. 281 - 284, 2001

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989, p. 2100.

SANCHES, E. M. C. ***Pneumocystis* sp e Circovírus tipo 2 (PCV2) em pulmões de suínos em abate, procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso e estudo das relações filogenéticas das amostras de *Pneumocystis* sp.** 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006a.

SANCHES, E. M. C.; BORBA, M. R.; SPANAMBERG, A.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L. G.; RAVAZZOLO, A. P.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO, L. Co-Infection of pneumocystis carinii f. sp. suis and porcine circovirus-2 (PCV2) in pig lungs obtained from slaughterhouses in southern and midwestern regions of Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 92 - 94, 2006b.

SANCHEZ, J. R. R. E.; NAUWYNCK, H. J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; PENSAERT, M. B. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 169 - 176, 2001.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Recherche**, v. 64, p. 10 - 19, 2012.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research**, v. 6, p. 119 - 142, 2005a.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. 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). **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 223 - 229, 2005b.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109 - 124, 2002.

SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; TIMMUS, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**, v. 162, p. 867 - 868, 2008.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 137 - 149, 2004.

SEGALES, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DELPOZO, M.; NOVAL, R.; SACRISTAN, C.; DELASHERAS, A.; FERRO, A.; LATIMER, K. S. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. **Veterinary Record**, v. 141, p. 600 - 601, 1997.

SEGALÉS, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A.; BRU, T.; CRISCI, E.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S.; BALASCH, M.; SIBILA, M.; XU, Z.; CHU, H. J.; FRAILE, L.; PLANA-DURAN, J. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. **Vaccine**, v. 27, n.52, p. 7313 - 7321, 2009.

SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; BLANCHARD, P.; BADIELLA, L.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; DOMINGO, M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **American Journal Veterinary Research**, v. 65, p. 88 - 92, 2004.

SILVEIRA, P. R. S.; TALAMINI, D. J. D. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Revista CFMV**, Brasília, v. 12, n. 42, p. 11 - 20, 2007.

SMITH, W. J.; THOMSON, J. R.; DONE, S. Dermatitis/ nephropathy syndrome of pigs. **Veterinary Record**, v. 132, p. 47, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. A.; FREITAS, A. R. Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção do Estado de Santa Catarina. **Comunicado técnico - EMBRAPA-CNPSA**, p. 1 - 4, 1987.

SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Production**. v. 8, p. 133 - 136, 2000.

STARK K. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine- a literature review. **The Veterinary Journal**, v. 159, p. 37-56, 2000.

STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep_ protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. **Virology**, v. 291, p. 152 - 160, 2001.

SZEREDI, L.; SZENTIRMAI, C. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine CIRCOVIRUS TYPE 2. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 5, p. 101 - 109, 2008.

SZEREDI, L.; DA'N, A.; SOLYMOSI, N.; CSA'GOLA, A.; TUBOLYET, T. Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia. **Veterinary Pathology**, p. 1-7, 2011.

TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I. M.; WIKSTROM, F. H.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; MCMENAMY, M.; MCNEILLY, F.; FUXLER, L.; BELAK, K.; PÖDERSOO, D.; SAAR, T.; BERG, M.; FOSSUM, C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) preand post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Virus Genes**, v. 36, p. 509 - 520. 2008.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMAN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, p. 64 - 66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v. 91, p. 271 - 276, 1986.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirua and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbe Bakteriell Org A**, v. 226, p. 153 - 167, 1974.

THONSON, J. R.; Williams, R. A.; DICK, J. D.; SUMPTION, K. Current and Future PCR Diagnostic Technology for Pig Disease. **The Pig Journal**, v. 46, p. 142 - 149, 2000.

VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. **Veterinary Research**, v. 31, p. 187-213, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. **The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 1167.

VIDIGAL, P. M. P.; MAFRAB, C. L.; SILVA, F. M. F.; FIETTO, J. L. R.; JÚNIOR, A. S.; ALMEIDA, M. R. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. **Virus Research**, v. 163, p. 320 - 327, 2012.

WEST, K. W.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 11, n. 6, p. 530 - 532, 1999.

YOUNG, M. G.; CUNNINGHAM, G. L.; SANFORD, S. E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 1 - 6, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Quadro das amostras de pulmão com e sem lesões pneumônicas macroscópicas coletadas do período de Agosto de 2010 à Janeiro de 2011

Ordem	Identificação da amostras	Lesão em pulmão	Granja	Abatedouro	PCV2 (PCR)
1	1 C	presente	Itú	Campinas	Positivo
2	2 C	presente	Itú	Campinas	Positivo
3	3 C	presente	Itú	Campinas	Negativo
4	4 C	presente	Itú	Campinas	Positivo
5	5 C	presente	Itú	Campinas	Positivo
6	11	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
7	12	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
8	13	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
9	14	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
10	15	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
11	16	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
12	17	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
13	18	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
14	19	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
15	20	ausente	E. S. Pinhal	Cosmópolis	Positivo
16	31 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
17	32 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
18	33 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
19	34 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
20	35 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
21	36 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
22	37 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
23	38 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
24	39 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
25	40 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
26	41 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
27	42 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
28	43 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
29	44 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
30	45 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
31	46 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
32	47 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
33	48 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
34	49 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
35	50	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
36	51	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
37	52	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
38	53 C	presente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
39	54	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
40	55	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
41	56	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
42	57	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
43	58	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
44	59	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
45	60 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
46	61 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
47	62 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
48	63 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo

Ordem	Identificação da amostras	Lesão em pulmão	Granja	Abatedouro	PCV2 (PCR)
49	64 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
50	65 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
51	66 C	presente	Itú	Carapicuíba	Negativo
52	67 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
53	68 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
54	69 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
55	70 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
56	71 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
57	72 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
58	73 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
59	74 C	presente	Itú	Carapicuíba	Positivo
60	75	ausente	Itú	Carapicuíba	Negativo
61	76	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
62	77	ausente	Itú	Carapicuíba	Negativo
63	78	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
64	79	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
65	80	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
66	81	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
67	82	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
68	83	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
69	84	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
70	85	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
71	86	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
72	87	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
73	88	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
74	89	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
75	90	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
76	91	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
77	92	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
78	93	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
79	94	ausente	Itú	Carapicuíba	Positivo
80	95 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
81	96 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
82	97 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
83	98 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
84	99 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
85	100 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
86	101 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
87	102 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
88	103 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
89	104 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
90	105 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
91	106 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
92	107 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
93	108 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
94	109 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
95	110 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
96	111 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
97	112 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
98	113 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Negativo
99	114 C	presente	Óleo	Carapicuíba	Positivo

Ordem	Identificação da amostras	Lesão em pulmão	Granja	Abatedouro	PCV2 (PCR)
100	115	ausente	Óleo	Carapicuíba	Negativo
101	116	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
102	117	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
103	118	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
104	119	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
105	120	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
106	121	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
107	122	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
108	123	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
109	124	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
110	125	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
111	126	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
112	127	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
113	128	ausente	Óleo	Carapicuíba	Negativo
114	129	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
115	130	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
116	131	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
117	132	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
118	133	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
119	134	ausente	Óleo	Carapicuíba	Positivo
120	135	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
121	136	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
122	137	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
123	138	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
124	139	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
125	140	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
126	141	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
127	142	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
128	143	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
129	144	ausente	Fartura	Carapicuíba	Positivo
130	145	ausente	Fartura	Carapicuíba	Negativo
131	146	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
132	147	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
133	148	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
134	149	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
135	150	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
136	151	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
137	152	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
138	153	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
139	154	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
140	155	ausente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
141	156 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
142	157 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
143	158 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
144	159 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Negativo
145	160 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Negativo
146	161 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Negativo
147	162 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
148	163 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
149	164 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
150	165 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo

Ordem	Identificação da amostras	Lesão em pulmão	Granja	Abatedouro	PCV2 (PCR)
151	166 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
152	167 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
153	168 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
154	169 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
155	170 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
156	171 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
157	172 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
158	173 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
159	174 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
160	175 C	presente	E. S. Pinhal	Rio Claro	Positivo
161	176	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
162	177	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
163	178	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
164	179	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
165	180	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
166	181	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
167	182	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
168	183	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
169	184	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
170	185	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
171	186	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
172	187	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
173	188	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
174	189	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
175	190	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
176	191	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
177	192	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
178	193	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
179	194	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
180	195	ausente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
181	196 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
182	197 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
183	198 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
184	199 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
185	200 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
186	201 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
187	202 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
188	203 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
189	204 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
190	205 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
191	206 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
192	207 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
193	208 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
194	209 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
195	210 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
196	211 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
197	212 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
198	213 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
199	214 C	presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo
200	215 C	Presente	Holambra	Cosmópolis	Positivo

APÊNDICE B - Tabelas de sequências obtidas pelo GenBank com: numero de acesso, grupo/cluster, genótipo, país de origem, ano, doenças associadas ao PCV (PCVAD), trabalhos de origem.

Numero de acesso	Grupo/Cluster	Genótipo	País	Ano	PCVAD	Utilizadas no trabalho
DQ141322	1A	PCV2b	China	2005	Desconhecido	OLVERA et al., 2007
DQ104422	1A		China	2005	Desconhecido	
DQ104420	1A		China	2005	Desconhecido	
AY188355	1A		China	2005	Desconhecido	
AY969004	1A		China	2005	Desconhecido	
DQ017036	1A		China	2005	Desconhecido	
AY849938	1A		China	2005	Desconhecido	
AY916791	1A		China	2005	Desconhecido	
AY484416	1A		Holanda	2004	PMWS	
AY484415	1A		Holanda	2004	PMWS	
AY484414	1A		Holanda	2004	PMWS	
AY484413	1A		Holanda	2004	PMWS	
AY484412	1A		Holanda	2004	Subclínico	
AY484411	1A		Holanda	2004	Subclínico	
AY484409	1A		Holanda	2004	Subclínico	
AY484408	1A		Holanda	2004	Subclínico	
AY682997	1A		China	2004	Desconhecido	
AY682993	1A		China	2004	Desconhecido	
AY682990	1A		China	2004	Desconhecido	
AY732494	1A		China	2004	Desconhecido	
AY691679	1A		China	2004	Desconhecido	
AY686764	1A		China	2004	Desconhecido	
AY686762	1A		China	2004	Desconhecido	
AY651850	1A		China	2004	PMWS	
AY641542	1A		China	2004	PMWS	
AY604430	1A		China	2004	Desconhecido	
AY613854	1A		China	2004	PMWS	
AY596823	1A		China	2004	PMWS	
AY596822	1A		China	2004	PMWS	
AY578327	1A		China	2004	PMWS	
AY579893	1A		China	2004	PMWS	
AY536756	1A		China	2004	PMWS	
AY536755	1A		China	2004	PMWS	
AY322003	1A		França	2004	Subclínico	
AY322002	1A		França	2004	Subclínico	
AY322001	1A		França	2004	Subclínico	
AY322000	1A		França	2004	PMWS	
AY321999	1A		França	2004	PMWS	

Numero de acesso	Grupo/Cluster	Genótipo	País	Ano	PCVAD	Utilizadas no trabalho
AY321998	1A	PCV2b	França	2004	Desconhecido	OLVERA et al., 2007
AY321997	1A		França	2004	PMWS	
AY321996	1A		França	2004	Desconhecido	
AY321995	1A		França	2004	PMWS	
AY321994	1A		França	2004	Subclínico	
AY321993	1A		França	2004	Subclínico	
AY321992	1A		França	2004	Subclínico	
AY321991	1A		França	2004	PMWS	
AY321990	1A		França	2004	PMWS	
AY321989	1A		França	2004	PMWS	
AY321988	1A		França	2004	PMWS	
AY321987	1A		França	2004	Subclínico	
AY321986	1A		França	2004	PMWS	
AY321985	1A		França	2004	Desconhecido	
AY321984	1A		França	2004	PMWS	
AY321983	1A		França	2004	Subclínico	
AY321982	1A		França	2004	Subclínico	
AY424405	1A		Austria	2003	Desconhecido	
AY424404	1A		Austria	2003	Desconhecido	
AY391729	1A		China	2003	PMWS	
AY256460	1A		Hungria	2003	PDNS	
AY256457	1A		Hungria	2003	PMWS	
AY291318	1A		China	2003	PMWS	
AY291316	1A		China	2003	PMWS	
AY217743	1A		China	2003	Desconhecido	
AY181945	1A		China	2003	PMWS	
AY177626	1A		China	2003	PMWS	
AF201897	1A		China	2000	PMWS	
AF538325	1A		China	2003	Desconhecido	
AY288134	1A		China	2003	Desconhecido	
AY288133	1A		China	2003	Desconhecido	
AY122275	1A		China	2002	Desconhecido	
AF201311	1A		França	2000	PMWS	
AY847748	1B		China	2005	PMWS	
AY484407	1B		Holanda	2004	Subclínico	
AY682995	1B		China	2004	Desconhecido	
AY682992	1B		China	2004	Desconhecido	
AY691169	1B		China	2004	PMWS	
AY678532	1B		China	2004	PMWS	
AY556475	1B		China	2004	PMWS	

Numero de acesso	Grupo/Cluster	Genótipo	País	Ano	PCVAD	Utilizadas no trabalho
DQ151643	1C	PCV2b	China	2005	Desconhecido	OLVERA et al., 2007
AY713470	1C		Alemanha	2005	Subclínico	
AY943819	1C		China	2005	Desconhecido	
AY484410	1C		Holanda	2004	Subclínico	
AY682996	1C		China	2004	Desconhecido	
AY682994	1C		China	2004	Desconhecido	
AY682991	1C		China	2004	Desconhecido	
AY686765	1C		China	2004	Desconhecido	
AY686763	1C		China	2004	Desconhecido	
AY556477	1C		China	2004	PMWS	
AY556476	1C		China	2004	PMWS	
AY556473	1C		China	2004	PMWS	
AY510375	1C		China	2004	PMWS	
AY291317	1C		China	2003	PMWS	
AY181947	1C		China	2003	PMWS	
AY181946	1C		China	2003	PMWS	
AY035820	1C		China	2001	PMWS	
AY556474	2	PCV2a	China	2004	PMWS	
AY146992	2		Taiwan	2002	Desconhecido	
AF201307	2		Alemanha	2000	PMWS	
AB072302	2A		Japão	2001	PMWS	
AF109398	2A		Canadá	2000	Desconhecido	
AF117753	2A		Canadá	2000	Desconhecido	
AY180397	2B		Taiwan	2003	Desconhecido	
AY180396	2B		Taiwan	2003	Desconhecido	
AY146993	2B		Taiwan	2002	Desconhecido	
AY146991	2B		Taiwan	2002	Desconhecido	
AF364094	2B		Taiwan	2001	Desconhecido	
AY256459	2C		Hungria	2003	PMWS	
AY256455	2C		Hungria	2003	PDNS	
AF201310	2C		Espanha	2000	PMWS	
AF201309	2C		Espanha	2000	PMWS	
AF201308	2C		Espanha	2000	PMWS	
AY322004	2D		França	2004	Subclínico	
NC005148	2D		Áustria	2003	Desconhecido	
AY424403	2D		Áustria	2003	Desconhecido	
AY424402	2D		Áustria	2003	Desconhecido	
AY424401	2D		Áustria	2003	Desconhecido	

Numero de acesso	Grupo/Cluster	Genótipo	País	Ano	PCVAD	Utilizadas no trabalho
AY256458	2D	PCV2a	Hungria	2003	PMWS	OLVERA et al., 2007
AY256456	2D		Hungria	2003	PMWS	
AY288135	2D		China	2003	Desconhecido	
AF381176	2D		China	2001	Desconhecido	
AF109399	2D		Canadá	2000	Desconhecido	
AF264043	2D		Estados Unidos	2000	PMWS	
AF201305	2D		Alemanha	2000	PMWS	
AF201306	2D		Alemanha	2000	PMWS	
DQ104423	2E		China	2005	Desconhecido	
DQ104421	2E		China	2005	Desconhecido	
DQ104419	2E		China	2005	Desconhecido	
AY699793	2E		Estados Unidos	2004	Desconhecido	
AY325495	2E		África do Sul	2003	PMWS	
AY094619	2E		Estados Unidos	2003	Desconhecido	
AY181948	2E		China	2003	PMWS	
AF465211	2E		Taiwan	2002	Desconhecido	
AF544024	2E		Coreia	2002	Desconhecido	
AF520783	2E		Coreia do Sul	2002	PDNS	
AF454546	2E		Coreia do Sul	2002	Desconhecido	
AB072303	2E		Japão	2001	PMWS	
AB072301	2E		Japão	2001	PMWS	
AF408635	2E		Canadá	2001	PMWS	
AF381177	2E		China	2001	Desconhecido	
AF381175	2E		China	2001	Desconhecido	
AF112862	2E		Canadá	2000	Desconhecido	
AF118097	2E		Canadá	2000	PMWS	
AF118095	2E		Canadá	2000	PMWS	
AF264042	2E		Estados Unidos	2000	PMWS	
AF264041	2E		Estados Unidos	2000	PMWS	
AF264040	2E		Estados Unidos	2000	PMWS	
AF264039	2E	PCV2a	Estados Unidos	2000	PMWS	OLVERA et al., 2007
AF264038	2E		Estados Unidos	2000	PMWS	

Numero de acesso	Grupo/Cluster	Genótipo	País	Ano	PCVAD	Utilizadas
------------------	---------------	----------	------	-----	-------	------------

						no trabalho
EU057185	1A	PCV2b	Brasil	2007	PMWS	CIACCI- ZANELLA et al. 2009
EU057184	2	PCV2a	Brasil	2007	Distúrbios reprodutivos	
EU057187	2		Brasil	2007	PMWS e PDNS	
EU057186	2D		Brasil	2007	Enterite	
EU057189	2E		Brasil	2007	PMWS	
EU057188	2E		Brasil	2007	PMWS	
AF055392	/	PCV2b	Canadá	1998	PMWS	SEGALÉS et al., 2008
AF055394	/		França	1998	PMWS	
EU148503	/	PCV2C	Dinamarca	1980	Subclínico	DUPONT et al., 2008
EU148504	/		Dinamarca	1987	Subclínico	
EU148505	/		Dinamarca	1990	Subclínico	

Fonte: Ferrari, 2012.

APÊNDICE C - Pares de *primers* P1/P2; P3/P4; P5/P6; P7/P8 utilizados no sequenciamento do PCV2. A localização, sequência e posição dos *primers* tem como referência uma amostra do GenBank (numero de acesso AF201897).

Fonte: adaptado AN et al., 2007.

APÊNDICE D - Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região ORF-1 das 22 sequências (genoma completo) de PCV2 do presente estudo. Os pontos indicam resíduos idênticos

330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 TGGAGCTCTAGATCTCAGGGGACCAACCGAGTGAACCTGTGTGAGATACCTGTGTGAGAGCGGAGTCTGGATCCGTCGAGAGCACCCCTGTACGTTTCAGAAATTCCTCCGCGGCTGGCTGAACTTTGAAGAGTACGGGAAAATG
 1 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 2 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 4 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 12 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 14 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 15 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 62 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 78 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 79 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 97 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 98 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 100 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 118 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 120 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 157 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 158 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 162 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 177 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 181 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 185 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 196 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
 204 ORF1
 G A P R S Q G Q R S D L S T A V S T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M

APÊNDICE E - Matriz de identidade de nuncleotídeos da região ORF-1 das 22 seqüências (genoma completo) de PCV2 do presente estudo.

Seq ORF-1	1	2	15	4	12	14	62	78	79	97	98	100	118	120	157	158	162	177	181	185	196	204
1	0,99	0,984	0,984	1	0,984	0,982	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,995	0,996	0,996	0,979	0,98	0,982	0,98	0,979
2	0,99	0,982	0,982	0,99	0,982	0,98	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982	0,986	0,987	0,987	0,989	0,99	0,991	0,99	0,989
15	0,984	0,982		0,984	1	0,996	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,979	0,98	0,98	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
4	1	0,99	0,984		0,984	0,982	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,995	0,996	0,996	0,979	0,98	0,982	0,98	0,979
12	0,984	0,982	1	0,984		0,996	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,979	0,98	0,98	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
14	0,982	0,98	0,996	0,982	0,996		0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,977	0,978	0,978	0,977	0,978	0,979	0,978	0,977
62	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998		1	1	1	1	1	1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
78	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1		1	1	1	1	1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
79	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1		1	1	1	1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
97	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1	1		1	1	1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
98	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1	1	1		1	1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
100	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1	1	1	1		1	1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
118	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1	1	1	1	1		1	0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
120	0,983	0,982	0,997	0,983	0,997	0,998	1	1	1	1	1	1	1		0,978	0,979	0,979	0,978	0,979	0,98	0,979	0,978
157	0,995	0,986	0,979	0,995	0,979	0,977	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978		0,998	0,998	0,975	0,976	0,977	0,976	0,975
158	0,996	0,987	0,98	0,996	0,98	0,978	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,998		1	0,976	0,977	0,978	0,977	0,976
162	0,996	0,987	0,98	0,996	0,98	0,978	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,998	1		0,976	0,977	0,978	0,977	0,976
177	0,979	0,989	0,978	0,979	0,978	0,977	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,975	0,976	0,976		0,998	0,997	0,998	1
181	0,98	0,99	0,979	0,98	0,979	0,978	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,976	0,977	0,977	0,998		0,998	1	0,998
185	0,982	0,991	0,98	0,982	0,98	0,979	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,977	0,978	0,978	0,997	0,998		0,998	0,997
196	0,98	0,99	0,979	0,98	0,979	0,978	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,976	0,977	0,977	0,998	1	0,998		0,998
204	0,979	0,989	0,978	0,979	0,978	0,977	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,978	0,975	0,976	0,976	1	0,998	0,997	0,998	

APÊNDICE F - Matriz de identidade de aminoácidos da região ORF-1 das 22 sequências (genoma completo) de PCV2 do presente estudo.

Seq ORF1	1	2	15	4	12	14	62	78	79	97	98	100	118	120	157	158	162	177	181	185	196	204
1	0,996	0,993	0,996	1	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	1	1	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
2	0,996	0,993	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1
15	0,996	0,993	0,996	0,996	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993
4	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	1	1	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
12	0,996	0,993	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993
14	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
62	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
78	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
79	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
97	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
98	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
100	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
118	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
120	0,993	0,99	0,996	0,993	0,996	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
157	1	0,996	0,996	1	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	1	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
158	1	0,996	0,996	1	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	1	1	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
162	1	0,996	0,996	1	0,996	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	1	1	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
177	0,996	1	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1
181	0,996	1	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1
185	0,996	1	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1
196	0,996	1	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1
204	0,996	1	0,993	0,996	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,996	0,996	0,996	1	1	1	1	1

[illegible]


```

650      660      670      680      690      700
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
1 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
2 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
4 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
12 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
14 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
15 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
62 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
78 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
79 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
97 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
98 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
100 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
116 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
118 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
120 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
156 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
157 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
158 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
162 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
163 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
177 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
181 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
185 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
196 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
199 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
201 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702
204 ORF2
R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L N P * 702

```

APÊNDICE H - Matriz de identidade de nucleotídeos da região ORF-2 das 27 sequências (22 genoma completo e 5 ORF-2) de PCV2 do presente estudo.

Seq	ORF-2	1	2	4	12	14	15	62	78	79	97	98	100	116	118	120	156	157	158	162	163	177	181	185	196	199	201	204
1		0,995	0,998	0,99	0,994	0,995	0,99	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,995	0,995	0,995	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
2		0,995		0,994	0,985	0,991	0,985	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,991	0,991	0,991	0,99	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,988	0,991	0,991	0,991	0,991
4		0,998	0,994		0,991	0,994	0,991	0,992	0,992	0,992	0,992	0,992	0,994	0,994	0,994	0,992	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,994	0,991	0,994	0,994	0,994	0,994
12		0,99	0,985	0,991		0,991	1	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,991	0,991	0,991	0,99	0,994	0,994	0,994	0,994	0,991	0,991	0,991	0,988	0,991	0,991	0,991	0,991
14		0,995	0,991	0,994	0,991		0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
15		0,99	0,985	0,991	1	0,991		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,991	0,991	0,991	0,99	0,994	0,994	0,994	0,994	0,991	0,991	0,991	0,988	0,991	0,991	0,991	0,991
62		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99		1	1	0,994	0,994	0,995	0,995	0,995	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
78		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99	1		1	0,994	0,994	0,995	0,995	0,995	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
79		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99	1	1		0,994	0,994	0,995	0,995	0,995	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
97		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99	0,994	0,994	0,994		1	0,998	0,998	0,998	1	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
98		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99	0,994	0,994	0,994	1		0,998	0,998	0,998	1	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
100		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,998	0,998	1	1	1	0,998	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
116		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,998	0,998	1	1	1	0,998	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
118		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,998	0,998	1	1	1	0,998	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
120		0,994	0,99	0,992	0,99	0,995	0,99	0,994	0,994	0,994	1	1	0,998	0,998	0,998	1	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,992	0,995	0,995	0,995	0,995
156		0,995	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	1	1	1	1	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
157		0,995	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	1	1	1	1	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
158		0,995	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	1	1	1	1	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997
162		0,995	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	1	1	1	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
163		0,995	0,991	0,997	0,991	0,994	0,991	0,992	0,992	0,992	0,992	0,992	0,994	0,994	0,994	0,992	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,991	0,994	0,994	0,994	0,994
177		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,991	0,994	0,994	0,994	0,994
181		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,991	0,994	0,994	0,994	0,994
185		0,992	0,988	0,991	0,988	0,994	0,988	0,992	0,992	0,992	0,992	0,992	0,994	0,994	0,994	0,992	0,994	0,994	0,994	0,994	0,991	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
196		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
199		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
201		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
204		0,995	0,991	0,994	0,991	0,997	0,991	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,994	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997