CINTIA MANZATTO BALDIN

Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2

São Paulo

2012

CINTIA MANZATTO BALDIN

Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2

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:

Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro

São Paulo

2012

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.2631
FMVZ

Baldin, Cintia Manzatto
Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2 / Cintia Manzatto Baldin. -- 2012.
109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro.

1. PCV2. 2. Infecção experimental. 3. Patogenia. 4. Transmissão horizontal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus Suíno tipo 2", protocolado sob o nº 1986/2010, utilizando 6 (seis) suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alessandra Marnie Gomes de Castro, 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 11/08/2010.

We certify that the Research "Evaluation of horizontal transmission and description of pathogenicity in piglets experimentally infected with Porcine Circovirus type 2", protocol number 1986/2010, utilizing 6 (six) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Alessandra Marnie Gomes de Castro, 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 08/11/2010.

São Paulo, 12 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

1934 | 2009 USP 75 FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BALDIN, Cintia Manzatto

Título: Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2

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: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conceder o privilégio da vida, me confortar e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Mauro e Mariluce, por todo o amor, companheirismo, exemplo, e principalmente por acreditarem na minha capacidade. Vocês são a minha base, amo vocês!

As minhas irmãs, Patrícia e Renata, que apesar de todas as diferenças, temos um só coração que nós unirá para sempre.

Aos meus sobrinhos, Beatriz, Enzo, Guilherme e Enrico, por alegrarem a minha vida e transmitirem um amor sincero e puro.

Ao meu namorado, Douglas pela paciência, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Dra. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro**, que desde a graduação colaborou com a minha formação profissional e monografia. Muito obrigada “mamis”, pela confiança, paciência, por todos os ensinamentos, atenção, exigência, incentivo, compreensão e principalmente por contribuir no meu crescimento pessoal e pela amizade construída.

Aos **Prof. Leonardo José Richtzenhain** e **Prof. Paulo Eduardo Brandão,** agradeço a oportunidade de estagiar e trabalhar no laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da USP e por todos os ensinamentos.

Ao **Prof. João Pessoa Araújo Júnior** e sua equipe, em especial a **Dra Tais Fukuta da Cruz,** pelo fornecimento do inóculo utilizado neste trabalho e troca de experiências sobre a PCR quantitativa.

Ao **Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes** e sua **equipe** da Escola de Veterinária da UFMG, por contribuírem neste trabalho com a realização dos testes histopatológicos.

Ao **Instituto de Zootecnia de Nova Odessa**, que possibilitaram a realização da parte experimental deste trabalho. Ao **PqC V Fernando Gomes de Castro Júnior** e **PqC V Fábio Enrique Lemos Budiño** e toda equipe, em especial **Roseli** e **Julio**, por toda ajuda e suporte prestados.

Ao **PqC V Fernando Gomes de Castro Júnior Castro** por todos os ensinamentos e experiência vivida durante a o pouco tempo de convivência que tivemos, a **Dra. Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro** por todo carinho e deliciosos almoços preparados, a **Maria José** pela amizade e companheirismo nos dias de trabalho no IZ. Vocês foram essenciais e jamais saberei como retribuir.

A **Sheila Oliveira Souza Silva**, muito obrigada pela amizade sincera construída durante esses quatro anos e pela força, incentivo e sugestões que você me deu. Espero que possamos nos encontrar mais vezes daqui para frente e que nossa amizade seja eterna.

A **Cintia Maria Favero**, por me ajudar em um momento difícil da minha vida pessoal e contribuir em muitos outros projetos. A sua amizade e carinho, me deram forças pra continuar.

As “xuxulets” **Cinthia Kiomi Mori** e **Katarina Baumgartner Yamada** por toda a contribuição, ajuda e amizade.

A **Gisele Ayres**, **Sueli Santos** e **Iracema de Barros** pela troca de experiências, amizade, risadas e apoio incondicional.

As colegas **Karen Ferrari, Camila Oliveira, Haila Chagas, Carolina Torres, Juliana Martins, Aline da hora, Paloma Tonietti, Andrea Esteves, Elisabeth Motta, Patricia Philipsen, Bruna Barbosa, Nara Thiers, Laila Andréia** pelos momentos de diversão e amizade.

Aos amigos e pós-graduandos: **Bianca Santos**, **Antonio Malheiros**, **Carlos Prudencio**, **Rafael Cipollo**, **Mariana Spolidorio**, **Marcos Lopes “Piauí”**, **Vasco Túlio**, **Danilo Saraiva**, **Jonas Filho**, **Fernanda Nieri**, **Amália Barbieri**, e aos demais pós-graduandos do VPS pela agradável convivência.

A **Alexandre Sanches**, **Sandra Sanchez**, **Danival Lopes**, **Tânia Delonero**, **Carol**, **Gisele de Oliveira**, **Renatinho**, **Zenaide Moraes**, **Maria Cristina Paick**, **Ana Virgínia Prado**, **Pedrinho**, **Jucélia**, **Claudia** e aos demais funcionários, pela amizade e convivência.

As **funcionárias da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice**, por toda atenção e eficiência demonstrada ao longo dessa etapa.

As minhas “amigas-irmãs” **Camila Bacan**, **Barbara Fracaroli** e **Carolina Colleto** pela paciência, compreensão nos meus momentos de ausência e incentivo.

E a todos os que direta ou indiretamente contribuíram no meu crescimento laboral e pessoal.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, processos número 2010/04287-4 e 2007/57115-3.

RESUMO

BALDIN, C. M. **Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2.** [Evaluation of horizontal transmission and description of patogenesis in piglets experimentally infected with Porcine Circovírus 2] 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Circovírus suíno 2 (PCV2) é responsável pelas doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD do inglês *Porcine circovirus associated disease*) que engloba várias condições clínicas. Acomete suínos nas principais áreas produtoras do mundo causando grandes prejuízos. A situação acerca do conhecimento acerca da complexa patogenia e os múltiplos fatores de risco permitem compreender apenas em parte o verdadeiro impacto das PCVADs em suínos, sendo este um conhecimento mais amplo e dependente de resultados obtidos com infecções experimentais. Os objetivos do presente trabalho foram: i) verificar a infectividade do isolado brasileiro de PCV2 em animais infectados experimentalmente; ii) verificar a transmissão horizontal do isolado brasileiro de PCV2 em animais infectados experimentalmente; iii) avaliar a patologia do isolado brasileiro nos animais infectados experimentalmente; e iv) avaliar a resposta imune humoral nos animais infectados experimentalmente com o isolado brasileiro. Foram utilizados nove leitões divididos em três grupos com três animais cada: i) G1 animais inoculados por via intra-nasal, com aproximadamente 49 dias de idade; ii) G2 animais não inoculados mantidos na mesma baia que os G1; e iii) GC animais controle. Amostras de soro, suabes (nasal e fecal) e dados de desempenho foram coletados semanalmente. Amostras de tecidos foram coletadas durante a necropsia, aos 42 dias após a inoculação (dpi). Os animais do GC foram acompanhados até 140 dias de idade. A infecção pelo PCV2 foi avaliada através da descrição das manifestações clínicas, alterações anatômicas e histológicas, quantificação do DNA de PCV2 nas amostras de soro, suabes e tecidos e detecção de anticorpo anti-PCV2 no soro. As técnicas utilizadas foram coloração de tecido pela Hematoxilina-Eosina (HE), reação em cadeia pela polimerase quantitativa (PCRq), imunohistoquímica (IHQ) e ELISA (do inglês *enzyme-linked imunossorbente assay*). Os resultados demonstraram que o

isolado brasileiro induziu infecção subclínica nos animais inoculados (G1), demonstrado através da detecção de baixa carga de DNA viral nos tecido e soros, ausência de sinais clínicos e achados histopatológicos característicos de PCVAD, além da ausência de soroconversão nos três animais inoculados. A transmissão horizontal foi demonstrada, pois em um animal contactante (G2) foi recuperado o DNA de PCV2 em vários tecidos. No entanto, a ausência de soroconversão, não permitiu avaliar a resposta imune humoral nos diferentes grupos (G1 e G2). Fatores como idade dos animais no momento da inoculação (49 dias), via de inoculação, inóculo e ausência de co-agentes podem ter contribuído para o desencadeamento dos resultados observados.

Palavras-chave: PCV2. Infecção experimental. Patogenia. Transmissão horizontal.

ABSTRACT

BALDIN, C. M. **Evaluation of horizontal transmission and description of pathogenesis in piglets experimentally infected with Porcine Circovírus 2.** [Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2]. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Porcine circovirus 2 (PCV2) is responsible for the porcine circovirus associated diseases (PCVAD) that encompasses several clinical conditions. It affects the main pig producing areas of the world, causing extensive damage. Currently, knowledge about the complex pathogenesis associated with the multiple risk factors provides insight into the true impact of PCVADs, depending on the extensive knowledge based on the experimental infections. The aims of this study were: i) verify the infectivity of the brazilian PCV2 in experimentally infected animals; ii) verify the horizontal transmission of the Brazilian PCV2 in experimentally infected animals; iii) evaluete the patology of Brasilian PCV2 in experimentally infected animals; iv) evaluete the humoral immune response in experimentally infected animals with the Brazilian isolate. Nine piglets were divided into three groups with three animal each: i) G1 inoculated animals by intranasally route, with approximately 49 days of age; ii) G2 non-inoculated animals maintained in the same pen that G1 and iii) GC control animals. Serum samples, swabs (nasal and fecal) and performance data were collected weekly. Tissue samples were collected during necropsy at 42 days post inoculation (dpi). Animals from GC were monitored up to 140 days of age. PCV2 infection was evaluated by clinical, anatomical and histological alteration, quantification of PCV2 DNA in serum samples, swabs and tissues and detection of PCV2 antibodies in serum. The techniques of tissue hematoxylin-eosin staining, polymerase chain reaction quantitative (PCRq), immunohistochemistry (IHC) and ELISA were used. The results showed that the Brazilian PCV2 virus induced subclinical infection in inoculated animals (G1), shown by the low viral DNA load in the tissue and serum, the lack of clinical and pathological signs of PCVAD and absence of seroconversion in the three inoculated animals. The horizontal transmission was demonstrated by the recovery of the viral DNA on one of contacting

animals in various tissues. However, the absence of seroconversion, does not allowed the antibody levels evaluation in the different groups (G1 and G2). Factors such as age at the time of inoculation (49 days), route of inoculation, inoculum and absence of co-agents may contribute to the onset of the observed results.

Key-words: PCV2. Experimental infection. Pathogenesis. Horizontal transmission.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais alojados nas baias de alvenaria com cama de maravalha no galpão inferior do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa..... 37

Figura 2 - Linha do tempo representativa do experimento..... 38

Figura 3 - Gráfico da curva de *Melt* da PCRq para PCV2 das diluições do DNA plasmidial nas cinco diluições selecionadas (10^{-3} a 10^{-7})..... 52

Figura 4 - Gráfico da curva de amplificação da PCRq para PCV2 das diluições do DNA plasmidial (10^{-3} a 10^{-7}) em ordem decrescente de diluição..... 52

Figura 5 - Gráficos da curva padrão da PCRq para PCV2 com as cinco diluições do DNA plasmidial (10^{-3} a 10^{-7}) utilizados nas reações..... 53

Figura 6 - Média, por grupo, das leituras da densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovírus IgG/IgM) para IgG e IgM anti-PCV2 no soro dos leitões dos sete aos 49 dias de idade..... 53

Figura 7 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas das amostras de soro do G1 e G2..... 56

Figura 8 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas amostras de suabes nasais e fecais do G1 e G2..... 57

Figura 9 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas amostras de tecidos do G1 e G2..... 58

Figura 10 - Média, por grupo, das leituras de densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovírus IgG/IgM) para IgG e IgM anti-PCV2 no soro dos leitões durante o período após a inoculação..... 60

Figura 11 - Aspectos dos órgãos do animal 727 do G1 demonstrando ausência de alterações anatomopatológicas durante a necropsia..... 61

Figura 12 - Aspecto do pulmão do animal 727 do G1 com ausência de regiões

hemorrágicas, necróticas e não colapsados..... 61

Figura 13 - Baço de suíno sem alteração: Folículo linfóide (A) com arteríola centrofolicular (seta), polpa vermelha (B) e trabécula (C). Coloração de hematoxilina e eosina, 100x..... 62

Figura 14 - Linfonodo de suíno negativo para a técnica de imuno-histoquímica para PCV2 contra corado com hematoxilina. Região cortical com os folículos linfóides (A), tecido linfóide difuso (B) e seios corticais (C), 100x..... 63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrições da divisão dos suínos em grupos e os respectivos tratamentos utilizados no experimento. 36

Quadro 2 - Descrições das manifestações clínicas apresentadas pelos suínos submetidos aos diferentes tratamentos durante o experimento..... 39

Quadro 3 - Descrições dos achados anatomopatológicos observados durante a necropsia dos suínos submetidos a diferentes tratamentos no experimento..... 40

Quadro 4 - Descrição dos pares de *primers* das PCRs utilizadas no experimento. Sequências de nucleotídeos e os respectivos valores dos tamanhos dos fragmentos amplificados..... 42

Quadro 5 - Condições utilizadas para amplificar os fragmentos dos genes de PCV2 e β-actina..... 42

Quadro 6 - Descrição dos pares de *primers* utilizados na PCR quantitativa de PCV2. Sequências de nucleotídeos e o valor do tamanho do fragmento amplificado..... 43

Quadro 7 - Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento de PCV2. Posição da região e o tamanho do fragmento amplificado baseado na sequência disponível no GenBank (n. acesso AF201897) 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diluição seriada da curva padrão, com seus respectivos valores de Ct e número de cópias de DNA obtidos pela PCRq para PCV2..... 51

Tabela 2 - Manifestações respiratórias observadas nos animais, submetidos aos diferentes tratamentos, durante o período após a infecção..... 54

Tabela 3 - Manifestações clínicas observadas nos animais, submetidos aos diferentes tratamentos, em relação à tosse 55

Tabela 4 - Códons e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeo (sublinhado) nas sequências entre o inóculo e as recuperadas dos suínos infectados com PCV2 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
Cap	proteína do capsídeo
CDCD	*cesarean-derived colostrum-deprived*
cm^3	centímetros cúbicos
CsCl	cloreto de césio
Ct	*threshold cycle*
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
dpi	dias após a inoculação
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
et al.	e colaboradores
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s^2)
g	Gramas
HE	hematoxilina-eosina
IHC	Imunohistoquimica
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
INF-γ	Interferon-gama
ISRE	Elemento de resposta interferon-estimulante
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
M	Molar
Min.	Minuto de hora

mM	Milimolar
mL	Mililitro
n	Número
NaCl	cloreto de sódio
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
ORF	Região aberta de leitura
Ori	Origem de replicação
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCRq	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
PCV	Circovírus suíno
PCVAD	Doenças associadas ao Circovírus suíno
PCV1	Circovírus suíno 1
PCV2	Circovírus suíno 2
pH	potencial hidrogeniônico
PK-15	cultura de células de rim de suíno
pmol	Picomol
PDNS	Síndrome de dermatite e nefropatia suína
PMWS	Síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos
PPV	Parvovírus suíno
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
RCR	*rolling-circle replication*
Rep	proteína de replicação
RNAm	RNA mensageiro
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIV	Vírus da influenza suína

seg	Segundos
SMDS	Síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos
SPF	livre de patógenos específicos
TE	tampão Tris-HCl EDTA pH 8,0
TBE	tris borato EDTA
Tm	*melting temperature*
TNFα	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
TTSuV1	Torque teno vírus suíno 1
TTSuV2	Torque teno vírus suíno 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
ºC	graus Celsius
+	Mais
-	Menos
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
µL	Microlitro
µg	Micrograma
+	Mais
=	Igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 OBJETIVOS 35

3 MATERIAL E MÉTODOS 36

3.1 FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO 36

3.2 INÓCULO 37

3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS 38

3.4 AMOSTRAS 39

3.4.1 **Soro e suabes** 39

3.4.2 **Tecidos** 40

3.5 MÉTODOS LABORATORIAIS 41

3.5.1 **Extração de DNA** 41

3.5.2 **PCR qualitativa (PCR)** 41

3.5.3 **PCR quantitativa (PCRq)** 43

3.5.3.1 Construção do plasmídeo recombinante 43

3.5.3.2 Construção da curva padrão e quantificação absoluta 44

3.5.3.3 PCRq com SYBR Green 45

3.5.3.4 Limiar de detecção da PCRq 45

3.5.3.5 Análise dos dados 46

3.5.4 **Sequenciamento** 47

3.5.4.1 Reações de PCR para amplificação do genoma do PCV2 47

3.5.4.2 Purificação de produtos de PCR 48

3.5.4.3 Reação de sequenciamento do PCV2 48

3.5.4.4 Precipitação 49

3.5.4.5 Eletroforese de sequenciamento 49

3.5.4.6 Análise das sequências 49
3.5.5 **ELISA**..... 50
3.5.6 **Testes HE (Hematoxilina-Eosina) e Imuno-histoquimica (IHC)** 50
3.5.7 **Análise descritiva dos dados** 50
4 RESULTADOS 51
4.1 RESULTADOS ANTERIORES A INFECÇÃO EXPERIMENTAL 51
4.2 PCRq 51
4.2.1 **Monitoramento dos animais** 53
4.2.2 **Análise do inóculo** 54
4.3 RESULTADOS POSTERIORES A INFECÇÃO EXPERIMENTAL 54
4.3.1 **Manifestações clínicas** 54
4.3.2 **PCRq** 55
4.3.2.1 Soros 55
4.3.2.2 Suabes 56
4.3.2.3 Tecidos 57
4.3.3 **Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos** 58
4.3.4 **ELISA** 60
4.3.5 **Achados anatomopatológicos** 60
4.3.6 **HE e IHC** 62
5 DISCUSSÃO 64
6 CONCLUSÃO 77
REFERENCIAS 78
APÊNDICES 92

1 INTRODUÇÃO

Circovírus suíno (PCV) é o menor vírus animal descrito com capacidade de replicação autônoma em células de mamíferos. É um vírus não envelopado, com 15 a 17 nm de diâmetro, com simetria icosaédrica e um genoma de DNA de fita simples (FIRTH et al., 2009; ICTV, 2012).

Atualmente, o PCV divide-se em duas espécies, Circovírus suíno 1 (PCV1) e o Circovírus suíno 2 (PCV2). PCV pertence ao gênero *Circovírus* da família *Circoviridae,* que compreende os circovírus suínos e os circovírus das aves (VAN REGENMORTEL et al., 2000; TOOD, et al., 2005; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; ICTV, 2012). PCV1 e PCV2 possuem um genoma de 1759 e 1757 nucleotídeos (nt), respectivamente (MANKERTZ et al., 2004; MANKERTZ, 2012). A identidade nucleotídea entre isolados da mesma espécie é maior que 90 % enquanto que entre as diferentes espécies varia de 68 a 78 % (CORTEY et al., 2011).

A densidade das partículas virais é de 1,33 - 1,34 g/cm^3 em gradiente de CsCl e o coeficiente de sedimentação corresponde a 57 S. Não possui atividade hemaglutinante em eritrócitos de uma ampla variedade de espécies animais e é resistente ao clorofórmio, ao pH 3,0, à temperaturas de 56 °C e 70 °C por 15 minutos, ao congelamento e à luz ultravioleta (ALLAN et al., 1994; ALLAN; ELLIS, 2000; SHIBATA et al., 2003). A inativação viral é atingida por desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e pelos compostos de amônia quaternária (GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011).

O PCV1 foi descrito como contaminante permanente de cultura de células PK-15 de rim suíno (ATCC-CCL 33) e é considerado não patogênico (TISCHER et al., 1974; TISCHER et al., 1896). O PCV2 é responsável pelas doenças associadas ao PCV2 (PCVAD, do inglês *Porcine circovirus–associated disease*) que se caracteriza por uma síndrome infecto-contagiosa que se apresenta de forma subclínica ou clínica (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

PCV2, com seu genoma de apenas 1,76 Kb, apresenta uma capacidade de codificação limitada. Essa estrutura compacta apresenta duas regiões intergênicas, na qual são flanqueadas e arranjadas de forma circular as duas principais regiões abertas de leitura (ORF do inglês *Open Reading Frame*), que codificam para as proteínas do

capsídeo viral (gene *cap*, localizado na ORF2) e para a replicase (gene *rep*, localizado na ORF1) (CHEUNG, 2003; MANKERTZ et al., 2004; MANKERTZ, et al, 2012).

Recentemente, a ORF 3, responsável pela tradução da menor proteína viral não estrutural (gpORF3), está se destacando. Estudos recentes demonstraram que apesar dessa proteína não estar relacionada à patogenicidade do PCV2, ela tem uma função importante na modulação da virulência (LIU; CHEN; KWANG, 2005; LIU et al., 2006; CHAIYAKUL et al., 2010; MANKERTZ et al., 2012).

Além das ORFs descritas anteriormente, outras já foram mapeadas por Hamel et al. (1998), sendo os valores da massa molecular de quatro dessas proteínas descritas em ordem descendente: ORF4, 13,3 kDa (nt 552-207); ORF5, 9,8 kDa (nt 1163-1448); ORF6, 6,7 kDa (nt 1518-1332); ORF7, 6,0 kDa (nt 1670-79). No entanto, a importância e/ou função, ainda, não foram descritas.

O PCV2 subdivide-se em três genótipos, PCV2-1, PCV2-2 e PCV2-3 (também denominados de PCV2a; PCV2b e PCV2c, respectivamente) (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; DUPONT et al., 2008). Recentemente, um novo genótipo foi descrito no Canadá, cujo genoma contém a ORF1 do PCV1 e a ORF2 do PCV2-1 (PCV2a). Esse foi denominado PCV1/2a e apresenta uma identidade de 86,4 %, 88,7 % e 86,5 % com PCV1, PCV2-1 (PCV2a) e PCV2-2 (PCV2b), respectivamente (GAGNON et al., 2010).

O genótipo de PCV2a e PCV2b encontram-se, atualmente, amplamente disseminado na população suína, apresentando uma prevalência entre 50 a 100 %, estando presente em granjas de suínos com diferentes padrões sanitários em todos os continentes (CLARCK, 1996; HARDING, 1997; SEGALÉS et al., 1998; CHOI; CHAE, 1999; ONUKI et al., 1999; MADEC et al., 2000; WELLENBERG et al., 2000; MUHLING et al., 2006; CASTRO et al., 2007; CHIARELLI-NETO et al., 2009). O PCV2c foi descrito apenas na Dinamarca em amostras de arquivo da década de 80 e o PCV1/2 em 2,5 % dos casos positivos do Canadá, não havendo relato em outras regiões (DUPONT et al., 2008; GAGNON et al., 2010).

Até o momento não há nenhuma evidência sorológica de infecção por PCV2 em humanos, aves, bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Estes dados suportam a hipótese de que a transmissão de PCV2 aos suínos a partir de outras espécies é

improvável (PATTERSON; OPRIESSNIG, 2010; GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011).

No entanto, estudos a campo e experimental demonstraram a susceptibilidade de roedores ao PCV2 e a transmissão horizontal e vertical em camundongo foi demonstrada experimentalmente (LORINCZ et al., 2010; LI et al., 2010; DENG et al., 2011; BALDIN et al., 2011; SANTOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011b). Não se sabe, até o momento, qual o papel desempenhado por roedores na epidemiologia do PCV2.

A transmissão do vírus ocorre verticalmente e horizontalmente, sendo este detectado em suabe nasal, bronco-traqueal, orofaríngeo, fecal e na urina de suínos naturalmente e experimentalmente infectados com PCV2. O contágio ocorre pelo contato direto entre animais, que foi observado tanto em experimentos realizados a campo quanto de infecção experimental. A principal via de transmissão horizontal é a oronasal, através do contato com fezes, urina ou outro animal infectado (SHIBATA et al., 2003; SEGALÉS et al., 2005a; GILLESPIE et al., 2009).

A transmissão indireta do PCV2 por via oral, aerossóis e vacinação apresenta menor potencial de infecção, quando comparadas a exposição direta de animais infectados ou suas secreções (PATTERSON; OPRIESSNIG, 2010).

A transmissão vertical intra-uterina ocorre devido à contaminação do sêmen, equipamentos de inseminação contaminados ou porcas infectadas com o PCV2, resultando em morte embrionária ou nascimento de leitões em viremia. Leitões infectados verticalmente podem ser fonte de transmissão de PCV2 para outros porcos e sucumbir à doença clínica durante o período de crescimento (GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011; MADSON; OPRIESSNIG, 2011).

Um levantamento realizado em granjas comerciais dos Estados Unidos e México demonstrou a detecção de DNA de PCV2 em 39,9 % e 47,2 % dos animais antes do desmame e no soro das porcas, respectivamente. No Brasil, DNA de PCV2 foi detectado em leite e colostro de porcas vacinadas e não-vacinadas. Esses resultados mostram que a infecção transplacentária está associada à viremia da porca e que a vacinação diminui, mas não elimina o leite e o colostro como fonte de infecção para leitões recém-nascidos (SHEN et al., 2010; GERBER et al., 2011; MADSON; OPRIESSNIG, 2011).

Os riscos do sêmen suíno como fonte de propagação do PCV2 também foram avaliados, mas na maioria dos estudos não houve correlação entre o sêmen utilizado e disseminação da doença. Além disso, a dose mínima de PCV2 no sêmen necessária para infectar fetos e porcas ainda é desconhecida (PATTERSON; OPRIESSNIG, 2010; MADSON; OPRIESSNIG, 2011; ROSE et al., 2012).

A primeira doença associada ao PCV2 descrita foi a síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos (SMDS) (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* - PMWS), uma doença sistêmica que acomete leitões desmamados. (HARDING; CLARK, 1997; ALLAN; ELLIS, 2000; CHOI; CHAE; CLARK, 2000). No entanto, por descrever parcialmente as doenças associadas ao PCV2 em 2002 propôs-se a troca de PMWS por PCVAD amplamente utilizada na América do Norte (do inglês *Porcine circovirus associated disease* – Circovirose suína) (ALLAN et al., 2002; SEGALÉS et al., 2005b).

O diagnóstico individual de PCVAD é realizado pela presença do agente em quantidades que variam de moderada a abundante nas lesões microscópicas. Para distinguir as diferentes manifestações é preciso avaliar a presença do PCV2 nos diferentes tecidos (intestino, pulmão e linfóide). Essas observações permitiram classificar as PCVAD clínicas que dividem-se em sistêmica, pneumonia associada ao PCV2, enterite associada ao PCV2, distúrbios reprodutivos associado ao PCV2 e síndrome de dermatite e nefropatia suína associada ao PCV2 (PDNS do inglês *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*). Além da apresentação clínica, a apresentação subclínica é muito comum e apresenta um grande impacto na suinocultura. Essas manifestações serão, resumidamente, descritas a seguir (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

A infecção sistêmica associada ao PCV2 caracteriza-se, clinicamente, por definhamento, emagrecimento ou diminuição na taxa de ganho de peso, palidez de pele e ocasionalmente icterícia. Além desses sinais mais comuns, observa-se ainda, dificuldade respiratória, tosse e diarreia. Um achado comum da doença clínica sistêmica é o aumento dos gânglios linfáticos (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012). As lesões macroscópicas incluem linfoadenopatia generalizada, falta de colabamento pulmonar e atrofia tímica. Com menos frequência atrofia hepática e lesões renais e ulcera gástrica. Lesões microscópicas caracterizam-se por infiltrações linfohistiocitárias e infiltrados inflamatórios granulomatosos multifocais em tecidos de

vários órgãos (pulmão, fígado, rim, coração e intestino). Portanto, na infecção sistêmica o agente deve ser detectado em mais de um órgão. A morbidade em granjas afetadas é geralmente de 4 a 30 % (ocasionalmente 50 - 60 %) e a mortalidade varia de 4 a 20 % (CHAE, 2005; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012).

A doença respiratória associada ao PCV2 é observada, principalmente, em leitões entre 8 a 26 semanas de idade e está associado a outros patógenos respiratórios. Caracteriza-se por diminuição da taxa de crescimento, aumento da conversão alimentar, febre, tosse e dispnéia. Evidencia-se pneumonia intersticial de gravidade variável, com ou sem bronquiolite necrotizante e/ou broncopneumonia. Pode haver, também, fibrose multifocal da lâmina própria das vias aéreas e bronquiolite obliterante (MOROZOV et al., 1998; HARMS et al., 2001; KIM; CHUNG; CHAE, 2003; MORANDI et al., 2010; SEGALÉS, 2012).

A enterite associada ao PCV2 acomete os leitões entre 8 a 16 semanas de idade, caracteriza-se por um espessamento da parede intestinal e aumento dos linfonodos. O diagnóstico baseia-se na presença de diarreia, lesões características na placa de Peyer e a demonstração do antígeno e acido nucleico nas lesões. Microscopicamente observa-se enterite granulomatosa e depleção linfocitária associada à presença abundante de PCV2 demonstrada através da imunohistoquímica da placa de Peyer (JENSEN et al., 2006; OPRIESSNIG et al., 2011a; SEGALÉS, 2012).

Na reprodução, o PCV2 está associado a distúrbios reprodutivos onde se observa falha na implantação, resultando em retorno irregular ao estro, tamanho de ninhada reduzido, aumento de abortamento, natimortos, mumificação fetal e aumento da mortalidade na fase pré-desmame. Histopatologicamente não foram caracterizadas as lesões em fetos abortados. Microscopicamente observam-se lesões no miocárdio caracterizadas por miocardite fibrosa ou necrotizante, com infiltração de células inflamatórias e macrófagos. Outras alterações microscópicas observadas são pneumonia intersticial multifocal não supurativa, broncopneumonia, congestão hepática e hepatite (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; MADSON; OPRIESSNIG, 2011).

A PDNS associada ao PCV2 é um processo patológico vascular imune-mediado. Possui incidência esporádica, porém alta taxa de mortalidade, afetando leitões nas fases de desmame, crescimento e terminação. Os animais apresentam-

se clinicamente anoréxicos e deprimidos. A dermatite manifesta-se sob a forma de lesões cutâneas avermelhadas ou púrpuras que, por coalescência, resultam em placas de tamanho crescente, principalmente nas patas traseiras e área perineal. As lesões renais fecham o diagnóstico para PDNS, onde os rins apresentam-se pálidos e aumentados, com petéquias hemorrágicas na cortical (DURAN; RAMOS-VARA; RENDER, 1997; DROLET et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2008; SEGALÉS, 2012).

Com intuito de reproduzir as manifestações clínicas de PCVAD observadas a campo, iniciaram-se os trabalhos de infecção experimental com PCV2.

Balasch et al. (1999) utilizaram 10 suínos de 16 semanas de idade, em que oito foram inoculados via intra-nasal com 10 mL de homogeneizado de tecido e dois permaneceram como controle. Apesar dos autores observarem uma queda de desempenho dos animais inoculados, nenhum sinal clínico foi observado. Lesões macro e microscópicas foram observadas nos animais, no entanto variaram de leve a moderada, não reproduzindo a forma clínica observada nos animais infectados naturalmente a campo. Os autores concluíram que a inoculação de homogeneizado de tecido contendo o vírus desenvolveu lesões semelhantes à PCVAD.

Resultados semelhantes foram observados por Magar et al. (2000) que utilizaram leitões livre de patógenos específicos (SPF do inglês *Specific Pathogen Free*) com idade entre três e quatro semanas. Os animais não apresentaram sinais clínicos e as lesões macroscópicas limitaram-se ao pulmão e linfonodos. Apesar do PCV2 produzir lesões compatíveis com as obervadas na PCVAD, os autores expuseram necessidade de mais estudos para esclarecer os fatores associados ao PCV2 para o desencadeamento da PCVAD observada nos casos a campo.

Bolin et al. (2001) utilizaram animais obtidos por cesária e privados de colostro para reproduzir a infecção por PCV2. Os autores observaram febre, depressão, icterícia e hiperpnéia, além de queda do desempenho entre os animais inoculados e controle. Macroscopicamente, o aumento dos linfonodos foi mais intenso nos animais que apresentaram febre, sendo as lesões microscópicas descritas em todos os animais que apresentaram esse sinal clínico. O DNA de PCV2 foi recuperado, com frequência variável, em várias amostras (tecidos, secreções e excreções) inclusive nos animais eutanasiados aos 125 dias após infecção (dpi). Os autores ainda descreveram a transmissão do vírus dos animais inoculados para os contactantes.

No entanto, Okuda et al. (2003), utilizando também animais obtidos por cesária e privados de colostro, relataram a presença de sinais clínicos nos animais que sucumbiram aos 21 e 28 dpi. Lesões macro e microscópicas foram observadas em todos os animais que apresentaram sinais clínicos. O DNA de PCV2 foi recuperado em todos os tipos de amostras dos animais inoculados necropsiado até 35 dpi, com maior título na maioria das amostras de tecidos dos animais com sinais clínicos, sendo ausente nos controles. Anticorpo anti-PCV2 foi detectado na maioria dos animais inoculados e contactantes entre 14 e 21 dpi, com ausência de detecção nos animais que apresentaram sinais clínicos até 28 dpi. Os autores concluíram que o PCV2 foi capaz de induzir a PCVAD clínica em suínos sem a presença de outros patógenos. Porém, ressaltaram a necessidade de estudos para investigar mecanismos pelo qual a replicação de PCV2 é aumentada ou suprimida, pois a replicação viral parece ser um fator importante no desencadeamento da PCVAD clínica.

Esses trabalhos iniciais de infecção experimental foram fundamentais para demonstrar o envolvimento de outros fatores no desencadeamento da PCVAD clínica. Atualmente, está determinado que quatro fatores influenciam o curso da doença clínica: (i) co-infecções; (ii) características do hospedeiro; (iii) imunomodulação e (iv) características do patógeno (GILLESPIE et al., 2009; GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011).

Portanto, uma das causas da diversidade de manifestações clínicas da infecção por PCV2 se deve as co-infecções e suas associações com o PCV2. Estudos de detecção de co-agentes demonstraram que na PCVAD sistêmica, além de PCV2, o Parvovírus suíno (PPV do inglês *Porcine parvovirus*), Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV do inglês *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) e, mais recentemente, Torque teno vírus suíno 1 (TTSuV1 do inglês *Torque Teno sus Virus 1)* e 2 são detectados (TAIRA et al., 2009; OPRIESSNIG; HALBUR, 2012). Na PCVAD reprodutiva, observa-se a detecção de PPV e PRRSV, enquanto que na respiratória os co-agentes envolvidos são vírus da influenza suína (SIV do inglês *Swine Influenza Virus*), *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pneumocistis carinii* (ELLIS et al., 1998; HARMS et al., 2001).

Os co-agentes influenciam o curso da doença clínica através de mecanismos como dano muco-ciliar dos tecidos do aparelho respiratório para

permitir a colonização bacteriana, indução de supressão imunológica, alteração da resposta das citocinas ou afetando a função dos macrófagos. Esses mecanismos interagem com o PCV2 resultando no desencadeamento da forma clínica da PCVAD (OPRIESSNIG et al., 2011b).

A replicação de PCV2 é um dos principais requisitos para o desenvolvimento da forma clínica da PCVAD, sendo aumentada pela presença de PPV e PRRSV no hospedeiro. Portanto, a infecção do animal com PPV, resultando no aumento da síntese de DNA celular, mitose e prolifeção de histiócitos e macrófagos, promovem condições ideais para a replicação de PCV2. Um mecanismo semelhante é observado nos animais co-infectados com PRRSV e PCV2 em que os monócitos e macrófagos são as células alvo para ambos os vírus (KENNEDY et al., 2000; ALLAN et al., 2000; KIM, CHUNG; CHAE, 2003).

In vitro o tratamento de cultivo de célula PK-15 com INF-γ resulta no aumento em 20 vezes de progênie de PCV2. Portanto, o aumento de INF-γ observado em animais infectados naturalmente com PRRSV e *M. hyopneumoniae* pode ser um dos fatores associados ao desencadeamento de PCVAD respiratórios severos, observados nas co-infecções (THANAWONGNUWECH; THACKER, 2003; MEERTS et al., 2005).

A indução de disfunção imune desencadeada pela infecção do hospedeiro por alguns agentes infecciosos, como PPV e PRRSV, também, interferem no desencadeamento da PCVAD clínica. *In vitro* a co-infeção de PPV-PCV2 resultou na diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos pulmonares. Além disso, o aumento da produção de TNFα e citocinas em reposta a inflamação sistêmica, liberado durante a fase aguda da infecção pelo PPV, têm sido considerados desencadeadores da PCVAD (KIM; HA; CHAE, 2006; LIU et al., 2011).

O real impacto dos co-agentes no desencadeamento da PCVAD clínica foi demonstrada nos trabalhos de infecção experimental realizados por diferentes grupos de pesquisa de PCV2 no mundo.

Em animais gnotobióticos, a co-infecção de PCV2+PPV desencadeou sinais clínicos severos, que resultou na eutanásia de um animal aos 30 dpi e lesões macroscópicas. Os autores concluíram que a reprodução de PCVAD em animais

gnotobióticos requer PCV2 e agentes adicionais como PPV (KRAKOWKA et al., 2000).

O impacto do PPV no desencadeamento da PCVAD, também, foi descrita no Brasil por Fernandes et al. (2006), onde utilizaram leitões SPF e um isolado de PCV2 de Santa Catarina. Os autores reproduziram a manifestação clínica e lesões histopatológicas mais severas e em maior proporção nos animais co-infectados com PPV, quando comparados aos infectados somente com PCV2, reforçando a hipótese de que a infecção por PCV2 seja acentuada pela co-infecção por PPV.

Um estudo recente realizado por Koene et al. (2012) analisaram o perfil de proteínas presentes no soro de animais infectados com PCV2 e co-infectados com PPV ou PRRSV, com objetivo de auxiliar no diagnóstico precoce da doença. Os autores verificaram que todos os animais co-infectados desenvolveram sinais clínicos da doença como depressão e queda no ganho de peso, sendo observado em 80 % e 10 % dos animais inoculados com PCV2/PRRSV e PCV2/PPV, respectivamente. Os resultados indicaram que a análise do perfil proteico tem potencial para detecção de infecção viral na fase inicial da doença, com detecção de animais infectados após 5 dpi e antes do aparecimento dos sinais clínicos.

Com o objetivo de estudar o papel das bactérias no desencadeamento da PCVAD, Opriessnig et al. (2004) utilizaram suínos com 28 dias de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos com 17 animais cada: grupo 1: não foi inoculado; grupo 2: foi inoculado com apenas *M. hyopneumoniae* aos 28 dias de idade; grupo 3: foi inoculado com *M. hyopneumoniae* e PCV2 aos 28 e 42 dias, respectivamente; e grupo 4: foi inoculado aos 28 dias com PCV2. A severidade das lesões macro e microscópicas e quantidade de PCV2 associado às lesões foram, significativamente, maiores nos animais co-infectados quando comparados aos outros grupos. Esse estudo demonstrou que *M. hyopneumoniae* potencializou a severidade de lesões associadas ao PCV2 no pulmão e linfonodos, aumentou e prolongou a presença de PCV2 e aumentou a incidência de PCVAD respiratória.

Além da tentativa de reproduzir as manifestações sistêmicas e respiratórias, que são as mais comuns, Opriessnig et al. (2011a) realizaram um experimento para verificar o envolvimento de PCV2 no desencadeamento da enterite em leitões na fase de crescimento através da inoculação via oral. Foram utilizados 120 leitões SPF de 28 dias, divididos em seis grupos: controle, PCV2 (inoculado com PCV2), LAW

(inoculado com *Lawsonia intracellularis*), SALM (inoculado com *Salmonella typhimurium*), PCV2-LAW (inoculado com PCV2 e *L. intracellularis*) e PCV2-SALM (inoculado com PCV2 e *S. typhimurium*). Os animais inoculados com PCV2, independente das co-infecções (2/10 PCV2, 1/10 PCV2-LAW, 3/10 PCV2-SALM) desenvolveram PCVAD com diarreia apresentando redução de peso entre 14 e 28 dpi. Esses animais apresentaram lesões microscópicas nos linfonodos e tecidos entéricos associados à presença abundante de PCV2. Os autores concluíram que o PCV2 pode induzir enterite, independente da presença de outros agentes e que o desafio oral pode ser uma importante via, até mesmo, uma via natural de transmissão de PCV2 em suínos na fase de crescimento.

O papel da raça de suíno no desencadeamento da PCVAD, também, foi investigado. Num levantamento em granjas da Espanha realizado por López-Soria et al. (2004) revelou uma menor taxa de mortalidade por PCV2 em Pietran puros ou mestiços em relação a animais mestiços Large White e Duroc.

Opriessnig et al. (2006a) infectaram animais das raças Duroc, Landrace e Large White com PCV2 e demonstraram uma pré disposição da raça Landrace em apresentar doenças e lesões de PVCAD. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que suínos da raça Landrace foram mais suceptíveis dos que a Pietran ao comparar a gravidade do PCV2 associado as lesões microscópicas (OPRIESSNIG et al., 2009).

Questionou-se, portanto, se essas diferenças estariam relacionadas a raça e/ou a genes que poderiam conferir resistencia ou susceptibilidade. Esse questionamento motivou o trabalho de Karlskov-Mortensen et al. (2008) que identificaram duas regiões do genoma do suíno, que contem genes ligados ao aumento da susceptibilidade a PCVAD. No entanto, mais trabalhos precisam ser realizados para confirmar esses resultados.

Estudos demonstraram que imunoestimulação, através da vacinação dos suínos para outros agentes (*M. hyopneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRSV e Peste suína Clássica), o uso de alguns adjuvantes vacinais (como o base-óleo) e o uso de drogas imunossupressoras, podem prolongar a viremia e potencializar a replicação do PCV2 resultando em aumento da severidade da PCVAD (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; GILLESPIE et al., 2009; GRAU-

ROMA; FRAILE; SEGALES, 2011). No entanto, o real impacto da imunomodulação, ainda é muito controverso.

Krakowa et al. (2001) estimularam o sistema imunológico de leitões, inoculados com PCV2, com *keyhole limpet haemocyanin* em adjuvante incompleto de Freund's (KHL/AFI). Os autores reproduziram manifestações clínicas e lesões macro e microscópicas de PCVAD, concluindo que a ativação do sistema imunológico é um componente importante para o desencadeamento da PCVAD pelo PCV2. Por outro lado, Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002) tentaram, sem sucesso, associar a imunoestimulação ao desencadeamento da PMWS em leitões SFP.

O genótipo é outro fator que tem sido associado ao desencadeamento e severidade da PCVAD. Estudos epidemiológicos indicam que, atualmente, o genótipo PCV2b é o mais prevalente nas infecções que ocorrem naturalmente. Isto seria um indicativo de que o PCV2b poderia ser mais virulento que o PCV2a. Entretanto, os resultados de estudos experimentais não são conclusivos para suportar a hipótese de que o PCV2a e PCV2b diferem em patogenicidade, pois não demonstraram grandes diferenças na virulência em suínos gnotobióticos e convencionais experimentalmente infectados (OPRIESSNIG et al., 2008a; GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011; TRIBLE; ROWLAND, 2012; OPRIESSNIG et al., 2012a).

Hasslung et al. (2005) compararam dois isolados de PCV2 com intuito de determinar a importância da virulência do agente no desencadeamento de PCVAD. Os autores relataram diferença entre os isolados, sendo o inóculo S-PCV2 mais virulento.

No entanto, Opriessnig et al. (2006b) realizaram um experimento com o objetivo de comparar a sequência e a patogenicidade de isolados de campo oriundos de casos de PCVAD clínico e subclínico. Os autores utilizaram 42 animais SPF de 49 dias de idade, distribuídos em três grupos: grupo 1 (controle-inoculado via intra-muscular com salina), o grupo 2 inoculado com PCV2-4838 (isolado de um animal sem evidencia de PCVAD) e o grupo 3 inoculado com PCV2-40895 (isolado de um animal com PCVAD sistêmica). A identidade entre os dois isolados era de 98,9 %, sendo nove na ORF2 e duas na ORF1. Os animais inoculados com PCV2-4838 tiveram um número de cópias de PCV2 no soro significativamente maior aos 7

dpi, que diminuiu aos 14, 21 e 28 dpi, quando comparado com os leitões do outro grupo inoculado. As lesões microscópicas nos tecidos linfóides foram menos severas e a quantidade de PCV2 associado às lesões foram menores nos animais inoculados com PCV2-4838. Os autores concluíram que isolados de PCV2 dos Estados Unidos diferem na virulência.

Para determinar a dinâmica de infecção e patogenicidade de dois isolados do PRRSV com os dois genótipos de PCV2 (PCV2a e PCV2b), o mesmo grupo (OPRIESSNIG et al., 2012a) co-infectaram suínos com PCV2a e/ou PCV2b e dois isolados de PRRSV (NC16845b e VR-2385). A co-infecção com PCV2 de ambos os genótipos resultou em lesões macro e microscópica, significativamente, mais grave no pulmão e uma forte resposta imunológica contra PRRSV, quando comparado aos animais infectados somente com PRRSV. Entretanto, o grupo de animais inoculados com o PCV2a apresentou uma maior média de temperatura retal com 9 dpi comparado aos animais infectados com PCV2b, associado a um atraso na resposta de anticorpos anti-PCV2 nesses animais.

Sinha et al. (2011) realizaram um estudo experimental para determinar o efeito do PRRSV na viremia e nas características de eliminação dos vírus em infecções associadas ao PCV2a e PCV2b. Não houve diferença na eliminação viral em ambos os grupos, indicando que não há nenhuma interação genótipo-específica com o PRRSV utilizado no estudo. A infecção por PRRSV prolongou, significativamente, a presença de DNA do PCV2 no soro e aumentou a quantidade de vírus eliminada nas secreções orais, nasais e fecais entre 28 e 70 dpi.

Além da associação ao genótipo, tentou-se verificar se a patogenicidade não estaria vinculada às mutações em regiões especificas e que não necessariamente estariam envolvidas na discriminação dos genótipos.

Fenaux et al. (2004a) inocularam leitões de 21 dias SPF com PCV2 isolado (VP1) e PCV2 após 120 passagens (VP120). O VP120 apresentou duas mutações de aminoácidos, localizadas nas posições 328 (C328G) e 573 (A573C). Foi detectada viremia em 9/10 e em 4/10 animais inoculados com PCV2/VP1 e PCV2/VP120, respectivamente. A duração média da viremia foi de três semanas e uma semana e meia para PCV2/VP1 e PCV2/VP120, respectivamente. Além do tempo e número de animais, o número de cópias genômicas de PCV2 no soro do grupo inoculado com PCV2/VP1 foram mais elevados quando comparados com os

animais do grupo inoculado com PCV2/VP120 (P <0,0001). As lesões macroscópicas e histopatológicas observadas nos animais inoculados com PCV2/VP1 foram mais severas aos 21 e 42 dias (P=0,0032 e P=0,0274, respectivamente). Os autores concluíram que as mutações na região do genoma que codificam proteínas do cápsideo de PCV2, apesar de resultarem em maior capacidade de crescimento de PCV2 *in vitro,* o atenuou *in vivo*.

A resposta imune humoral, também tem um papel importante na modulação do curso da infecção do PCV2. A observação da relação entre o início da resposta ativa e a infecção de PCV2 por Meerts et al. (2005) demonstrou que anticorpos neutralizantes para PCV2 são detectados 15 dias após infecção em animais que apresentam alta taxa de replicação viral. Portanto, há uma relação entre a ausência ou atraso da produção de anticorpos neutralizantes e o aumento da replicação viral em animais infectados experimentalmente. Ainda, segundo Ostanello et al. (2005), a disseminação e persistência do vírus nos tecidos dependem do título de anticorpos anti-PCV2 no momento da inoculação e/ou infecção.

Além dos vários aspectos descritos anteriormente que podem de forma direta e/ou indireta interferir no curso da infecção por PCV2, um estudo de meta-análise de trabalhos publicados até 2007 de infecção experimental realizado por Tomás et al. (2008) apontou outros fatores que interferem no desencadeamento da PCVAD. Os autores analisaram 44 trabalhos e verificaram que o sucesso em reproduzir a PCVAD experimentalmente está associada à: i) uso de animais privados de colostro, ii) inoculação dos animais antes das três semanas de idade, iii) altas doses de inóculo, além do iv) subtipo de PCV2 inoculado e v) co-infecções, já discutidos acima.

Portanto, a diversidade de fatores que interferem, mesmo em condições controladas (infecção experimental), mostra claramente a complexidade da patogenia do PCV2, em que múltiplos fatores podem interferir no curso da PCVAD. Uma vez que a PCV ocorre no Brasil, torna-se importante o entendimento da transmissão e patogenia dos vírus que circulam no rebanho brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Verificar a infectividade do isolado brasileiro de PCV2 em animais infectados experimentalmente;

2.2 Verificar a transmissão horizontal do isolado brasileiro de PCV2 em animais infectados experimentalmente;

2.3 Avaliar a patologia do isolado brasileiro nos animais infectados experimentalmente;

2.4 Avaliar a resposta imune humoral nos animais infectados experimentalmente com o isolado brasileiro;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO

Nove leitões mestiços, de ambos os sexos (sendo três fêmeas e seis machos castrados) com idades variando entre 49 e 51 dias e negativos para PCV2 através da técnica de PCR e com títulos de IgG anti-PCV2 próximos à 0,3 quantificado pelo ELISA de captura, foram selecionados para compor o experimento, realizado nas instalações do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia Diversificada do Instituto de Zootecnia na cidade de Nova Odessa, São Paulo.

Os leitões foram divididos, aleatoriamente, em três grupos com três animais cada: o grupo G1 formado por animais que receberam três inoculações, o grupo G2 formado por animais não inoculados que permaneceram na mesma baia do G1 e o grupo GC que foram mantidos em um galpão separado de G1 e G2, como grupo controle, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 - Descrições da divisão dos suínos em grupos e os respectivos tratamentos utilizados no experimento

Grupo	***Identificação animal***	***Tratamento***
G1 (n = 3)	**722**	Inoculados em 0, 2 e 4 dpi
	727	
	729	
G2 (n = 3)	**721**	Não inoculados, contactantes de G1
	737	
	738	
GC (n = 3)	**719**	Controle negativo para PCV2
	724	
	742	

Durante o período de 42 dias de experimento, os animais foram mantidos no sistema de criação em cama sobreposta de maravalha (Figura 1). A desinfecção e controle de insetos foram realizados com o uso de Virkon-S® (Du Pont) e Colosso Pulverização® (Ouro Fino). Os animais receberam ração adequada para cada fase (Apêndice A), seguindo normas do NRC (1998) e água *ad libitum*.

Figura 1 - Animais alojados nas baias de alvenaria com cama de maravalha no galpão inferior do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa

Diariamente foi realizada a inspeção geral dos animais para anotar dados referentes às manifestações clínicas e avaliar o desenvolvimento adequado dos mesmos. Semanalmente foram coletadas amostras de sangue dos três grupos e suabes de fezes e de secreções nasais do G1 e G2 para posterior realização de testes laboratoriais, conforme fluxograma no apêndice B.

Aos 91 dias de idade os animais do G1 e G2 foram eutanásiados e coletados tecidos para posterior análise laboratorial. Os animais do GC permaneceram até os 120 dias de idade como controle negativo para infecção de PCV2, não sendo eutanasiados. Em decorrência disto, não foram obtidos resultados referentes a análise dos tecidos do GC.

3.2 INÓCULO

Os animais foram inoculados com o isolado brasileiro de PCV2, que foi cedido e quantificado por PCR em tempo real pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior do Departamento de Microbiologia e Imunologia do

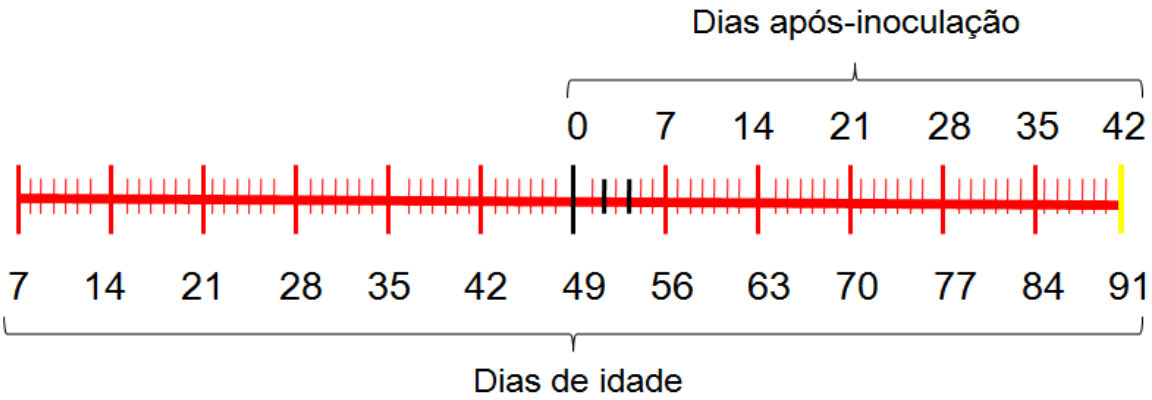
Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, campus Botucatu.

O isolamento foi realizado em célula ST, sendo confirmado através de PCR em tempo Real (procedimentos realizados na UNESP/Botucatu). O DNA do inóculo foi extraído (3.5.1) e seqüenciado (3.5.4). O sequenciamento permitiu realizar uma árvore filogenética e classificar o isolado em PCV2b.

O inóculo também foi testado por reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para os seguintes agentes: parvovírus suíno (PPV), *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae,* conforme descrito no apêndice C.

Os três leitões do G1 foram inoculados aos 49 dias de idade com 3 mL do isolado brasileiro de PCV2b (4,89 x 10^6 partículas virais/mL) via intra-nasal conforme demonstrado na figura 2. O momento da inoculação foi determinado pelo título de IgG dos animais através do ELISA de captura.

Figura 2 - Linha do tempo representativa do experimento



As barras verticais em preto (▌) indicam os dias em que os animais foram inoculados (aos 49, 51 e 53 dias de idade); a barra vertical em amarela (▌) indica o momento da eutanásia

3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dados referentes às manifestações clínicas foram coletados diariamente conforme discriminado no quadro 2. Outros eventuais sinais clínicos relacionados a

distúrbios do sistema nervoso, como tremores, desordens locomotoras e convulsões, e de pele foram anotados.

Quadro 2 - Descrições das manifestações clínicas apresentadas pelos suínos submetidos aos diferentes tratamentos durantes o experimento

Dados referentes à	***0***	***1***	***2***	***3***
Alteração das fezes	Normal	Moles	Aquosas	-------
Alteração da respiração	Normal	Dispnéia ou taquipneia leve	Dispnéia ou taquipneia moderada	Dispnéia ou taquipneia severa
Tosse	Ausente	Leve	Moderada	Severa
Mucosa oral	Rósea	Pálida	Ictérica	Cianótica

3.4 AMOSTRAS

3.4.1 **Soro e suabes**

A coleta de sangue foi realizada semanalmente, com os animais sedados (Destress® a 1 mg/Kg), através da punção da veia jugular e/ou veia cava cranial, com o sangue sendo armazenado em tubo de polipropileno para retração do coágulo. As amostras foram conservadas sob refrigeração (cerca de 4 ºC) até serem processadas. No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 2000 x *g* por 10 minutos a 20 °C e os soros foram aliquotados em microtubos de 1,5 mL e armazenados a –20 °C.

As amostras de fezes e secreções foram coletadas utilizando suabes com ponta de rayon friccionado na ampola retal e nas mucosas, respectivamente. Estes foram colocados em tubo contendo meio de Stuart e armazenada sob refrigeração. No laboratório, os suabes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH8,0) e, posteriormente, armazenados à -20 °C até o momento de sua utilização.

3.4.2 **Tecidos**

Após um jejum de 12 horas, a eutanásia dos animais do G1 e G2 (n = 6) foi conduzida com tranquilização utilizando Azaperona (Destress®) de 0,1mL/kg via intramuscular e anestesia geral com 10 mg/Kg de pentobarbital sódico intravenoso a 2,5 % (Thiopentax®) seguida da aplicação de 40 mL cloreto de potássio à 19,1 % intravenoso.

Durante a necropsia foi realizado um exame completo em todos os órgãos. As lesões anatomopatológicas foram comparadas com as descritas no quadro 3 (OPRIESSNIG et al., 2004). Amostras de pulmão, fígado, baço, rim, intestino (duodeno, jejuno e íleo), linfonodos (mesentérico, inguinal e mediastino) foram coletadas. Estes órgãos foram separados em alíquotas e congeladas a – 20 °C para posterior extração de DNA (item 3.5.1), sendo os órgãos linfóides também fixados em formalina tamponada a 10 % para análise patológica (itens 3.5.5).

Quadro 3 - Descrições dos achados anatomopatológicos observados durante a necropsia dos suínos submetidos a diferentes tratamentos no experimento (OPRIESSNIG et al., 2004)

Órgãos	***Descrição dos achados anatomopatológicos***
Pulmão	Não colapsados, firmes, partes escurecidas e regiões hemorrágicas.
Fígado	Mosqueado, diminuição dos lóbulos, pálido e aumento de tecido conjuntivo.
Linfonodos	Aumento de tamanho e pálidos na superfície do corte.
Baço	Aumentado, não congesto e carnoso na superfície do corte.
Rim	Focos brancos na superfície subcapsular, palidez e aumento de volume.
Intestino	Regiões hiperêmicas, regiões dilatadas e ulcerações.

3.5 MÉTODOS LABORATORIAIS

3.5.1 **Extração de DNA**

Para extrair o DNA dos tecidos foram utilizados 100 μL da solução a 20 % (Peso/Volume) em TE, para que todas as extrações partissem de uma mesma massa (20 mg), otimizando os resultados da PCR quantitativa.

O DNA das amostras de soro, tecido e suabes foi extraído utilizando o protocolo de Proteinase K e fenol:clorofórmio, descrito a seguir.

Foram adicionados 500 μL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 100 mM; EDTA 25 mM, pH 8,0; Duodecil Sulfato de Sódio 1 % e 10 μL de Proteinase K a 20 mg/mL) a 100 μL de amostra. O material foi homogeneizado e incubado à 56 °C por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 250 μL de fenol e 250 μL de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 400 μL de propanol. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a -20 °C por duas horas.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 25 minutos a 4 °C. O sedimento foi suspenso em 900 μL de etanol a 70 %, centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento seco em banho-seco (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56 °C por 10 minutos. Por fim, o DNA foi suspenso em 30 μL de TE e incubado em banho-seco a 56 °C por 15 minutos. As amostras com DNA extraído foram armazenadas a –20 °C até a sua utilização.

3.5.2 **PCR qualitativa (PCR)**

As amostras de soro, suabes e tecidos foram testadas para o gene da *β-actina* pela PCR com o intuito de descartar falso negativo. As amostras de soro,

coletadas durante o período dos sete aos 42 dias de idades, foram testadas por PCR para detecção de PCV2 para monitorar a circulação viral nos animais durante esse período antes da inoculação.

As amplificações para *β-actina* e PCV2 foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de DNA extraído, 12,5 µL de *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* (2X) (Fermentas, EUA), 10 pmol de cada *primer* (senso/antisenso), específico para cada gene alvo (quadro 4) e 8 µL água livre de DNAse q.s.p. Os controles negativos da reação e da extração consistiram de água ultrapura estéril.

Quadro 4 - Descrição dos pares de *primers* das PCRs utilizadas no experimento. Sequências de nucleotídeos e os respectivos valores dos tamanhos dos fragmentos amplificados

Detecção	*Primers**	Sequência 5' - 3' (nt)	Fragmento
β-actina	AC1	TGA GAC CTT CAC GCC	850 bp
	AC2	ATC TGC AAG GTG GAC	
PCV2	Fa	ATT ACC AGC AAT ACC CCG T	467 bp
	Ra	CAA CCC TCC TAC CAC TCC	

*Identificação pessoal dos *primers*

As amplificações foram realizadas em termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research), nas condições descritas no quadro 5.

Quadro 5 – Condições utilizadas para amplificar os fragmentos dos genes de PCV2 e β-actina

Detecção	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação de DNA	Hibridação dos *Primers*	Polimerização	Extensão
β-actina	94 °C/ 3 min.	50	94 °C/10 seg.	55 °C/10 seg.	72 °C/10 seg.	72°C/10 min.
PCV2	95 °C/ 5 min.	40	95 °C/1 min.	52 °C/30 seg.	72 °C/30 seg.	72°C/10 min.

As amostras de soro coletadas dos animais aos 49 dias de idade foram testadas por PCR para: PPV, *B. bronchiseptica, P. multocida* e *M. hyopneumonia para c*onfirmar a ausência desses co-agentes nos animais, os quais poderiam interferir no experimento. As PCRs para cada co-agente estão descritas no apêndice C.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de transiluminação do gel de agarose a 1,5 % em luz ultravioleta, após sua coloração em uma solução de brometo de etídeo a uma concentração de 0,5 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O tamanho do fragmento amplificado foi comparado a um padrão de 100 pb (Invitrogen, USA), sendo fotodocumentado e analisado através do Ingenius, Syngene Bio Imaging.

3.5.3 **PCR quantitativa (PCRq)**

3.5.3.1 Construção do plasmídeo recombinante

Para a obtenção do plasmídeo recombinante utilizado na construção da curva padrão da PCR quantitativa, os *primers* SybPCV2F e SybPCV2R, descritos no quadro 6, foram utilizados para gerar um *amplicon* de 145 pb (pares de bases) da ORF2 do PCV2.

A reação para a obtenção do *amplicon* foi conduzida em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de DNA de uma amostra de controle positivo para PCV2, 12,5 µL de *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* (2 X) (Fermentas, EUA), 10 pmol de cada *primer* (senso/antisenso) e 8 µL água livre de DNAse q.s.p.

Quadro 6 - Descrição dos pares de *primers* utilizados na PCR quantitativa de PCV2. Sequências de nucleotídeos e o valor do tamanho do fragmento amplificado

Detecção	**"Primers*"**	**Sequência 5' - 3' (nt)**	**Fragmento**
PCV2	SybPCV2F	ATA ACC CAG CCC TTC TCC TAC C	145 pb
	SybPCV2R	GGC CTA CGT GGT CTA CAT TTC C	

*Identificação pessoal dos *primers*

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research, Bio-Rad, EUA), nas condições descritas a seguir: 95 °C/ 5 min., seguido de 29 ciclos (94 °C/30 seg., 53 °C/30 seg. e 72 °C/ 30 seg.) e uma extensão final a 72 °C/5 min.

Após a visualização deste fragmento em gel de agarose a 1,5 %, o kit InsTAclone™ PCR Cloning (Fermentas, USA) foi usado para a purificação. A inserção do fragmento no vetor de clonagem pTZ57 (InsTAclone™ PCR Cloning kit, Fermentas, USA), na região lacZ, foi realizado seguindo o protocolo do fabricante. Após a inserção, células competentes da linhagem JM 109 de *Escherichia coli* foram transformadas adicionando-se 2,5 µL da reação de ligação (plasmídeo + inserto) a 50 µL de célula competente seguido de incubação em gelo por 5 minutos.

Posteriormente, foi realizado o plaqueamento de 25 µL de células transformadas em Meio Luria-Bertani (LB: 1 % Triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % de cloreto de sódio) com ampicilina (100 µg/mL), 40 µL de XGal a 20 mg/mL (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*) e 40 µL IPTG a 100mM (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Estas placas foram incubadas aproximadamente 18 horas a 37 °C.

As colônias recombinantes foram selecionadas, inoculadas em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e o DNA plasmidial, com inserto, foi extraído com o kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Alemanha). A confirmação da obtenção do DNA plasmidial recombinante foi feita através de sequenciamento.

3.5.3.2 Construção da curva padrão e quantificação absoluta

O DNA plasmidial contendo o inserto de 145 pb foi quantificado por meio de um espectrofotômetro a 260 nm (Nanodrop 2000c Spectrophotometer®, Thermo Scientific), sendo realizadas diluições seriadas na base de 10 para a construção da curva padrão. A concentração do DNA viral foi definida através da soma das massas em gramas do inserto e do vetor (disponível *online* em: http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html), convertida em número de cópias de DNA por microlitro, através da fórmula descrita no apêndice D.

Desta forma, estas diluições obtidas foram convertidas em número de cópias de alvo e empregadas como padrão para a quantificação das amostras coletadas, sendo também aplicadas para a avaliação da sensibilidade de detecção da PCR em tempo real.

A curva-padrão foi utilizada para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva. Este dado foi utilizado para calcular a eficiência da amplificação (ε). Uma alta eficiência está associada a uma inclinação de, aproximadamente, 3,32 para cada diluição de 10 do alvo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005; TOO, 2003). *Slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100 % indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR quantitativa (KUBISTA et al., 2006).

3.5.3.3 PCRq com SYBR Green

A reação foi desenvolvida com o uso do kit Maxima® SYBR® Green/ ROX qPCR MasterMix (Fermentas®), conforme as instruções do fabricante, em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL Platinum® SYBR® Green, 5,2 µL de água destilada, 4 µL da amostra por reação e 0,4 µL de cada *primer* a 10 pmol, descritos no quadro 6. As amplificações foram realizadas no aparelho *One Step* (Applied Biosystems), nas condições descritas a seguir: 50 °C / 2 min., 95 °C / 2 min., 40 ciclos (94 °C / 1 min. 60 °C / 1 min. e 72 °C / 1 min.), seguidos de uma curva de dissociação de 95 °C a 60 °C

As reações foram feitas em *strips* com oito poços cada, sendo adicionado a cada reação uma diluição serial do DNA plasmidial padrão, dois controles negativos (água ultra-pura) e as amostras de DNA a serem analisadas. As amostras não foram analisadas em duplicata, entretanto todas foram repetidas, ao mínimo, duas vezes independente da reprodutibilidade dos resultados. A carga viral foi expressa através do número de cópias de DNA por suabe, por mililitro de soro e por 20 mg de tecido.

3.5.3.4 Limiar de detecção da PCRq

Para determinar o limite de detecção da PCR quantitativa, foi realizada a amplificação do fragmento de 145 pb do genoma do PCV2 usando as diluições

seriadas na base de 10 (10^1 a 10^{-8}) do DNA plasmidial com o inserto, em duplicatas, conforme detalhado no item 3.5.3.3.

O limiar foi definido através da determinação do *threshold,* análise da curva de dissociação e dos Ct (*threshold cycle*) produzidos por cada diluição e da curva padrão fornecidas pelo *software* StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems, Canada). Cinco diluições que apresentarem Ct entre os ciclos 18 a 31,6 foram escolhidas para serem usadas como referência na quantificação da carga viral do PCV2 nas amostras do experimento.

3.5.3.5 Análise dos dados

Em cada amostra foi analisada a eficiência da reação, a curva de *Melting* (*Cm*) e a curva de amplificação. A análise da *Cm* foi realizada para avaliar a especificidade do produto de PCRq. Para isso, a fluorescência das amostras foi monitorada no final do ciclo com o aumento da temperatura, resultando na desnaturação com liberação do SYBR® Green. O momento da queda em 50 % da fluorescência, ou seja, a temperatura de *melting* (T*m*), foi calculada pelo *software* StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems, Canada).

A sensibilidade analítica foi definida pela amplificação da mais alta diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA (TOO, 2003). Paralelamente, a sensibilidade foi avaliada por meio do número de cópias do produto amplificado. A partir da solução estoque foram obtidas soluções de diluições seriadas na base de 10 que foram utilizadas como padrão (de $9,7 \times 10^5$ a $9,7 \times 10^1$ cópias de DNA plasmidial/µL). Essas concentrações, com quantidades conhecidas de DNA, foram utilizadas pelo *software* para efetuar a quantificação de DNA alvo nas amostras teste.

Para especificidade analítica utilizou-se amostras de PCV2a, PCV2b e dos co-agentes.

Os dados de quantificação das diferentes amostras (soros, suabes e tecidos) foram transformados em log da base 10 e analisados em gráficos com média e desvio padrão (por grupo) para cada momento do experimento.

3.5.4 **Sequenciamento**

Quatro amostras de tecidos linfóides dos suínos do G1 e duas do G2, que apresentaram alta carga de PCV2 pela PCRq, foram selecionadas para serem sequenciadas.

3.5.4.1 Reações de PCR para amplificação do genoma do PCV2

A PCR para amplificação do genoma do PCV2 foi conduzida com os pares de *primers* descritos no quadro 7. Os quatro fragmentos, quando sobrepostos compreendem todo o genoma do PCV2. Em cada reação com volume final de 25 µL foram adicionados 12,5 µL de *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* (2 X) (Fermentas, EUA), 1 µL de cada *primer* (P1/P2; P3/P4; P5/P6 e P7/P8) a 10 pmol e 8 µL de água DNAse *free* q.s.p. e 2,5 µL de DNA extraído.

Quadro 7 - Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento de PCV2. Posição da região e o tamanho do fragmento amplificado baseado na sequência disponível no GenBank (n. acesso AF201897)

Primers*	**Posição da região alvo**	**Sequência 5' - 3'(nt)**	**Fragmento (pb)**
P1/P2	116–135	TAA TCC TTC CGA AGA CGA GC	629
	726–745	CGA TCA CACA GTC TCA GTA G	
P3/P4	531–550	CAG AAG CGT GAT TGG AAG AC	630
	1142–1161	ATG TAG ACC ACG TAG GCC TC	
P5/P6	863–882	AGA AGC TCT TTA TCG GAG GA	701
	1545–1564	AAG CGA ACC ACA GTC AGA AC	
P7/P8	1360–1379	CTA GAA TAA CAG CAC TGG AG	621
	193–214	GTT CGT CCT TCC TCA TTA CC	

*Identificação pessoal do *primers*

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research, Bio-Rad, EUA), nas seguintes condições: 94 °C/ 5

min., seguido de 35 ciclos (94 °C/30 seg., 51 °C/30 seg. e 72 °C/1 min.) e uma extensão final a 72 °C/5 min.

Os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados através de transiluminação do gel de agarose a 1,5 % em luz ultravioleta, após sua coloração em uma solução de brometo de etídeo a uma concentração de 0,5 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para verificar a presença de banda única.

3.5.4.2 Purificação de produtos de PCR

Os produtos das PCRs foram purificados com o uso de ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (USB® Products Affymetrix, Cleveland, USA), onde foram adicionados 4 µL deste em 10 µL de produto de PCR. Em seguida foi incubado no Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf® a 37º C / 15 min. e inativado por aquecimento a 80 ºC / 15 min. O DNA foi armazenado a –20 °C até a sua utilização ou imediatamente utilizado na reação de sequenciamento.

3.5.4.3 Reação de sequenciamento do PCV2

As amostras purificadas foram submetidas à reação de sequenciamento de DNA, sendo separadas para cada *primer.* No volume final de 10 µL contendo 1 µL de BigDye v.3.1 (Applied Byosystems™), 2 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems™) e 0,4 µL de cada *primer* a 10 pmol (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8) foi adicionado 6,6 µL do DNA alvo. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 96 ºC / 1 min., seguida de 39 ciclos de 96 ºC / 15 seg., 50 ºC / 15 seg. e 60 ºC / 4 min.. As amostras foram mantidas a 4ºC até a precipitação.

3.5.4.4 Precipitação

Os produtos das reações foram purificados por precipitação através do método EDTA-Etanol. Foram adicionados 5 µL de EDTA a 125 mM e 30 µL de etanol a 100 % em 10 µL de produto de reação, seguido de homogeneização. O material foi incubado em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado a 14.000 x *g* por 30 minutos a 12 ºC. O sobrenadante foi descartado por inversão e 60 µL de etanol a 70 % foram adicionados, seguido de centrifugação a 14.000 x *g* por 20 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento foi seco em termobloco (DNA thermal cycler 480 - Perkin Elmer) à 95 ºC por 5 minutos. A reação precipitada foi armazenada a - 20 ºC até a eletroforese de sequenciamento.

3.5.4.5 Eletroforese de sequenciamento

Aos produtos de precipitação foram adicionados 10 µL de formamida (Applied Biosystems®, USA) permanecendo em banho-seco por 2 minutos a 95 ºC para desnaturação, seguido de 2 minutos em gelo. Posteriormente, foram submetidas à eletroforese em Seqüenciador Automático modelo 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, USA).

3.5.4.6 Análise das sequências

A sequência consenso do genoma total de PCV2 de cada amostra foi obtida através do aplicativo PhredPhrap (disponível *online* em: http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/). As sequências de nucleotídeos das amostras foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW implementado pelo programa BioEdit versão 7.0.5, sendo comparadas com a sequência do inóculo

utilizado no experimento e outras 140 sequências disponíveis (apêndice E) do GenBank (disponível *online* em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

3.5.5 **ELISA**

Para as amostras de soro dos suínos coletadas semanalmente foram realizados o ELISA de captura para detecção de anticorpos IgG e IgM específico para PCV2, utilizando-se o Kit INGEZIM Circovirus IgG/IgM (Ingenasa, Espanha) conforme instruções do fabricante. A leitura a 450 nm foi validada quando os controles positivo e negativo apresentarem valores ≥0,7 e ≤0,3 para IgG e IGM, respectivamente. O ponto de corte foi calculado multiplicando-se os valores das leituras a 450 nm dos controles positivos por 0,4 e 0,3 para IgM e IgG, respectivamente.

3.5.6 **Testes HE (Hematoxilina-Eosina) e Imunohistoquimica (IHC)**

Os testes de IHC e HE foram realizados pela equipe do Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte. As IHC foram realizadas somente em tecidos linfóides, com o uso de anticorpos policlonais.

3.5.7. **Análise descritiva dos dados**

Os resultados foram analisados através de análise descritiva, utilizando uma medida de tendência central (média, procurando o melhor valor que representasse todos os valores da pesquisa) e uma medida de variabilidade (desvio padrão, para saber quanto os escores distavam da média) para comparação dos resultados obtidos entre os grupos do experimento, na tentativa de identificar associações relevantes com alguma variável. Para melhor interpretação foram utilizados gráficos e tabelas.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS ANTERIORES À INFECÇÃO EXPERIMENTAL

4.1.1 PCRq

A sensibilidade analítica foi determinada com diluições seriadas na base de 10 e foi de 9,7 x 10^1 cópias de DNA plasmidial/µL com *Ct* = 31,6, a qual correspondeu à diluição de 10^{-7} do DNA padrão (Tabela 1). Para a quantificação da carga viral do PCV2, foram selecionadas cinco diluições (10^{-3} a 10^{-7}), considerando um *threshold* igual a 1,1. As amostras que apresentaram um *Ct* ≤ 30 e valores de *Tm* próximos ao exibido pela curva padrão foram consideradas positivas.

Tabela 1 – Diluição seriada da curva padrão, com seus respectivos valores de Ct e número de cópias de DNA obtidos pela PCRq para PCV2

Diluição do DNA Padrão	*Ct*	Cópias de DNA
10^{-2}	15,6	9.700.000
10^{-3}	**18,2**	**970.000**
10^{-4}	**21,4**	**97.000**
10^{-5}	**24,2**	**9.700**
10^{-6}	**27,8**	**970**
10^{-7}	**31,6**	**97**
10^{-8}	34,1	9.7

A análise da *Cm* encontra-se na figura 3, onde se observa a formação de um pico único, com a *Tm* de 78,26 °C. A formação desse único pico demonstra a ausência da formação de dímeros e/ou reação inespecífica.

O gráfico da curva de amplificação está apresentado na figura 4 em que um mesmo padrão de amplificação foi observado nas diferentes diluições.

A partir da curva padrão (Figura 5), com as cinco diluições selecionadas pode-se demonstrar a manutenção linear dos cinco pontos da concentração de DNA

padrão, com eficiência de reação (Eff) igual a 99,9 % (R^2= 0,999, ε = 0,99 e *slope* = -3,32), confirmando o desempenho do sistema para detecção de PCV2.

Portanto, as amostras que apresentaram um *Ct* ≤ 30 e valores de *Tm* próximo ao exibido pela curva padrão foram consideradas positivas, sendo quantificadas e seus valores numéricos inseridos nos cálculos. As amostras consideradas negativas, com *Ct* ≥ 30 e/ou *Tm* diferente da curva, foram inseridas com o valor 0 (zero) nos cálculos.

Figura 3 - Gráfico da curva de *Melt* da PCRq para PCV2 das diluições do DNA plasmidial nas cinco diluições selecionadas (10^{-3} a 10^{-7})

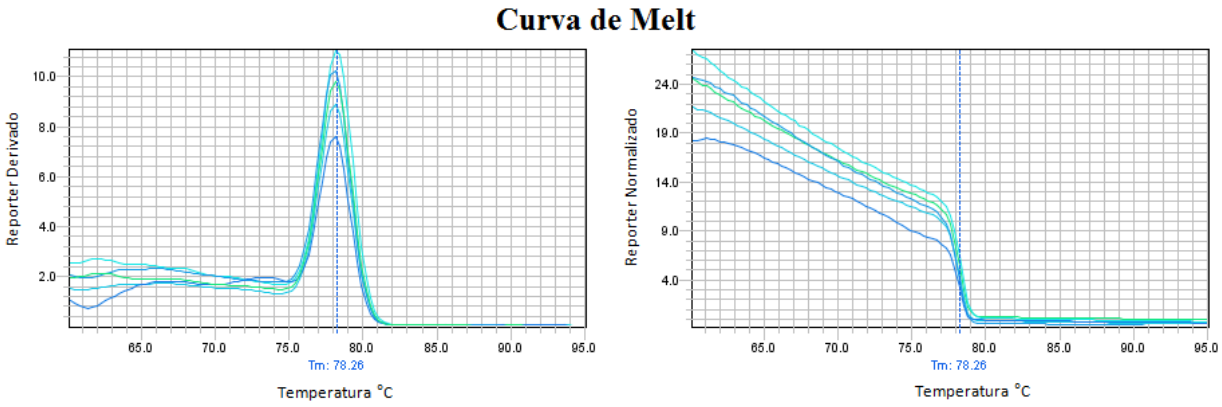


Figura 4 - Gráfico da curva de amplificação da PCRq para PCV2 das diluições do DNA plasmidial (10^{-3} a 10^{-7}), em ordem decrescente de diluição

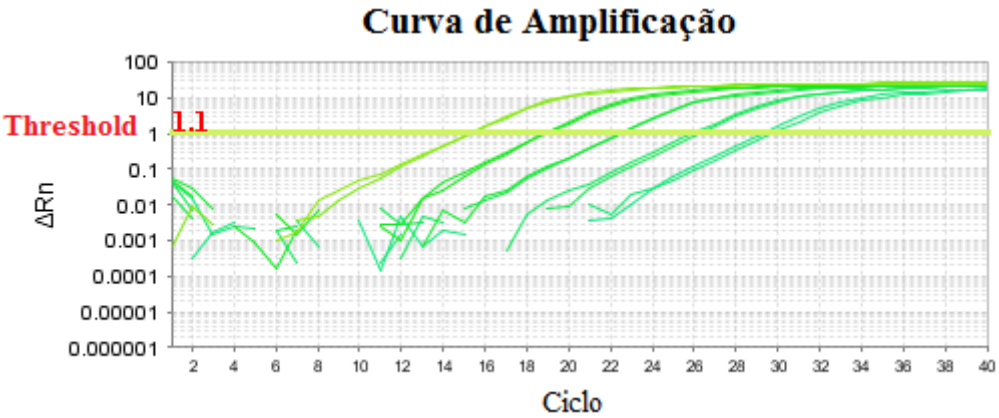
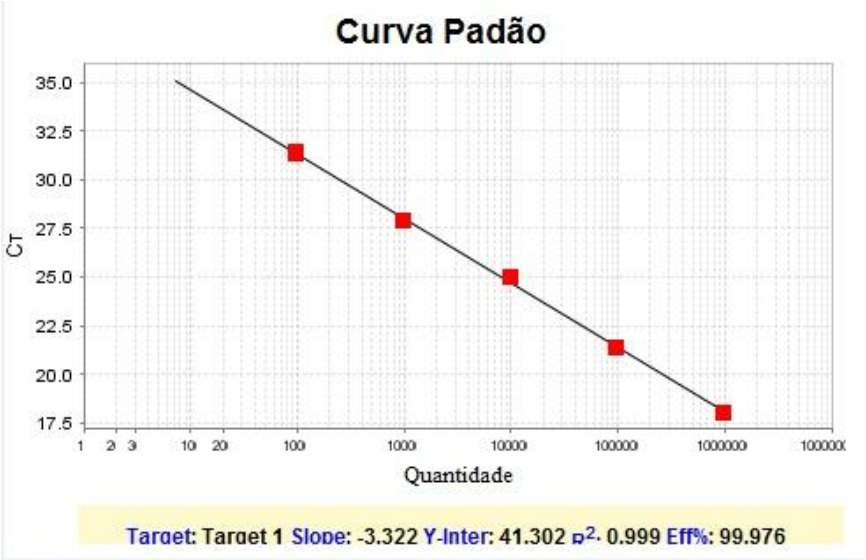


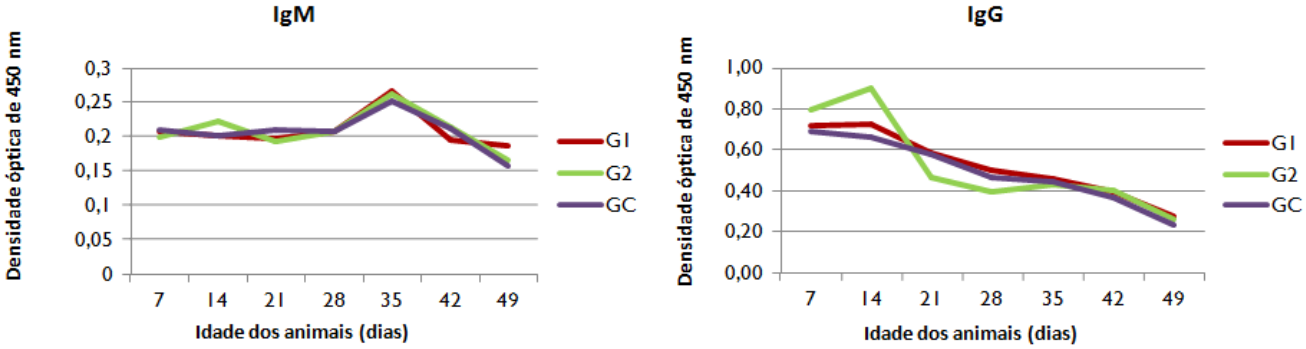
Figura 5 - Gráfico da curva padrão da PCRq para PCV2 com as cinco diluições do DNA plasmidial (10^{-3} a 10^{-7}) utilizadas nas reações



4.1.2 Monitoramento dos animais

Os títulos de IgG anti-PCV2, dos sete aos 49 dias de idade, decaíram nos nove animais do experimento. No mesmo período, os títulos de IgM permaneceram negativos, conforme demonstrado nas figuras 6 e apêndice F.

Figura 6 - Média, por grupo, das leituras da densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovirus IgG/IgM) para IgG e IgM anti-PCV2 no soro dos leitões dos sete aos 49 dias de idade



Durante esse mesmo período (dos sete aos 49 dias de idade), todos os animais foram negativos para o DNA de PCV2 através da PCR, confirmando a ausência de circulação viral nos animais.

Aos 49 dias de idade, momento da inoculação, o soro dos animais foram

negativos para os co-agentes testados (PPV, *B. bronchiseptica, P. multocida* e *M. hyopneumoniae*) através da PCR.

4.1.3 **Análise do inóculo**

O inóculo foi negativo pela PCR para PPV, *B. bronchiseptica, P. multocida* e *M. hyopneumoniae*, confirmando a ausência de co-agentes.

4.2 RESULTADOS POSTERIORES À INFECÇÃO EXPERIMENTAL

4.2.1 **Manifestações clínicas**

A partir da segunda semana após a inoculação três animais dos grupos G1/G2 apresentaram discretas alterações das fezes, como fezes pastosas. Após esse período nenhuma alteração foi observada em relação às fezes durante todo o experimento.

Aos 21 e 28 dpi quatro animais dos grupos G1/G2 apresentaram alteração da respiração, como dispnéia leve e moderada, respectivamente. Observou-se, também, quadro de taquipnéia moderada (Tabela 2). O animal 738 do grupo G2 apresentou moderada dispnéia durante essas duas semanas, com progressiva melhora na semana seguinte.

Tabela 2 - Manifestações respiratórias observadas nos animais, submetidos aos diferentes tratamentos, durante o período após a infecção

Dados referentes à alteração respiratória						
Grupos	**7 dpi**	**14 dpi**	**21 dpi**	**28 dpi**	**35 dpi**	**42 dpi**
G1	0	0	1	2	0	0
G2	0	0	1	2	0	0
GC	0	0	0	0	0	0

*Os números da tabela referem-se aos seguintes escores: 0 = Normal; 1 = Dispnéia ou taquipneia leve; 2 = Dispnéia ou taquipneia moderada; 3 = Dispnéia ou taquipneia severa.

Manifestações de tosse foram progressivas em relação ao seu grau de severidade no decorrer do experimento, em todos os animais G1/G2 (Tabela 3). Aos 28 dpi os animais apresentaram tosse moderada progredindo para severa aos 42 dpi.

Tabela 3 - Manifestações clínicas observadas nos animais, submetidos aos diferentes tratamentos, em relação à tosse

Dados referentes à manifestação da tosse						
Grupos	***7 dpi***	***14 dpi***	***21 dpi***	***28 dpi***	***35 dpi***	***42 dpi***
G1	0	1	1	2	2	3
G2	0	1	1	2	2	3
GC	0	0	0	0	0	0

* Os números da tabela referem-se aos seguintes escores: 0 = Ausente; 1 = Leve; 2 = Moderada; 3 = Severa.

Não houve aparecimento de sinais clínicos relacionados a distúrbios do sistema nervoso, como tremores, desordens locomotoras e convulsões. Também não foram observadas alterações dermatológicas. A mucosa oral dos animais permaneceu rósea durante todo o experimento.

4.2.2 **PCRq**

Todas as amostras de DNA extraídas (soro, suabes e tecidos) foram positivas para detecção do gene da *β-actina* através da PCR, demonstrando a ausência de inibidores que pudessem interferir na PCR e/ou ausência de falhas da extração do DNA. Essas amostras foram, então, submetidas à PCRq para detecção e quantificação do PCV2.

4.2.2.1 Soros

Os leitões do GC permaneceram negativos para PCV2 através da PCR durante todo o período do experimento e acompanhamento (até 120 dias de idade). Ao zero dpi as amostras de soro dos leitões foram negativas para PCV2 pela PCRq.

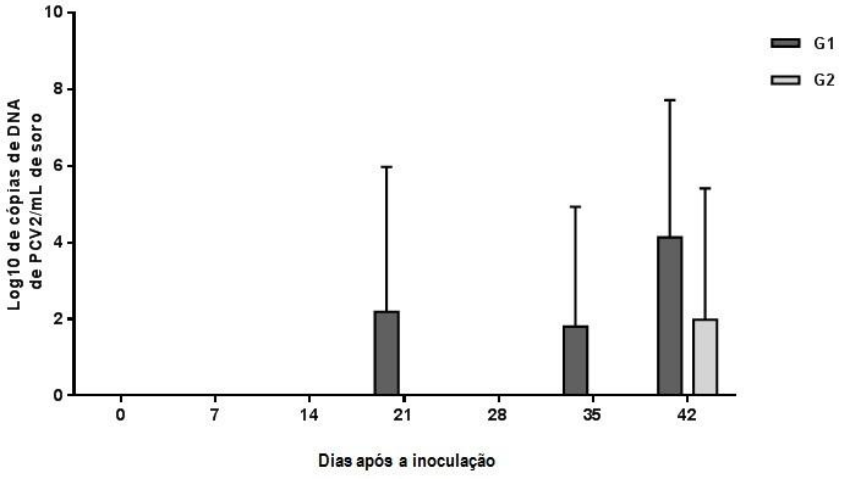
Nos animais inoculados (G1) foi detectada início da viremia nos animais 722,

729 e 727 aos 21, 35 e 42 dpi, respectivamente. A carga viral variou de 2,97 x 10^4 a 3,59 x 10^6 cópias de DNA de PCV2/mL de soro, sendo a maior carga observada aos 21 dpi. Aos 91 dpi apenas dois animais foram positivos (729 e 727). O animal 722 foi negativo na semana seguinte à detecção do PCV2 em seu soro, permanecendo negativo até o final do acompanhamento (Apêndice G)

Nos animais contactantes (G2) somente o animal 738 entrou em viremia no final do experimento (42 dpi), onde apresentou 8,7x10^5 cópias de DNA de PCV2/mL de soro (Apêndice G).

A média e desvio padrão da carga viral de PCV2 presente nos soros de cada grupo encontram-se na figura 7, onde a maior média observada foi aos 42 dpi para o grupo G1. O desvio padrão aparece com um grande intervalo, devido alta variabilidade dos dados e a inserção do valor zero para os animais considerados negativos. O maior intervalo observado em G1 aos 21 e 42 dias e no G2 aos 42 dias teve interferência do número de animais negativos que foi de 2, 1 e 2, respectivamente.

Figura 7 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas amostras de soro do G1 e G2



4.2.2.2 Suabes

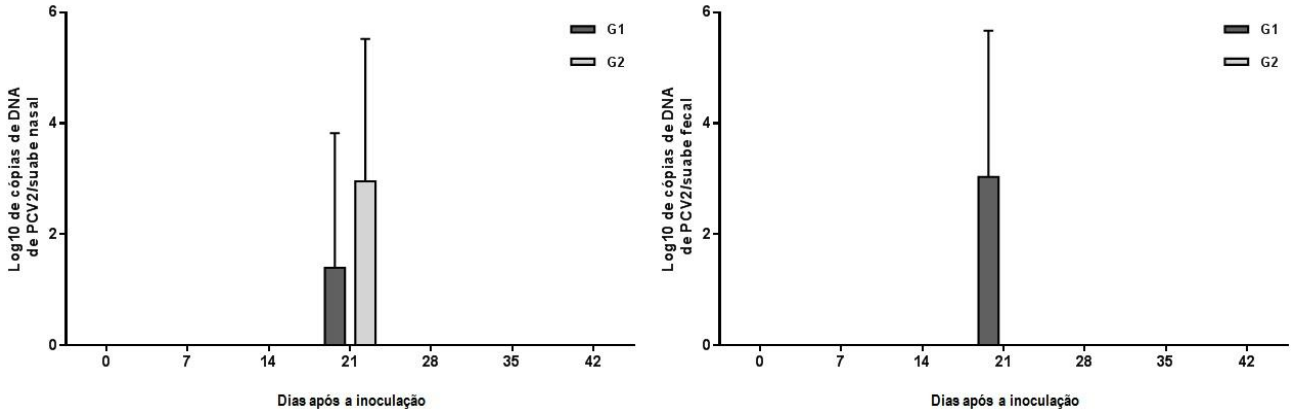
Nos suabes fecais dos animais do G1 o DNA viral do PCV2 foi encontrado nos animais 727 e 729, apenas aos 21 dpi, onde a carga viral encontrada foi de

$2,90x10^4$ e $4,49x10^4$ cópias de DNA/suabe, respectivamente. No G2, não foi detectada a presença do vírus nas fezes (Apêndice H).

Nas secreções nasais o DNA viral somente foi encontrado aos 21 dpi em ambos os grupos, em um animal do G1 (729) e dois animais do G2 (737 e 738), apresentando carga viral de $1,60x10^4$, $1,98x10^4$ e $3,71x10^4$ cópias de DNA/suabe, respectivamente (Apêndice I).

A média e desvio padrão da carga viral de PCV2 presente nos suabes nasais e fecais de cada grupo encontram-se na figura 8, onde a maior média viral observada foi nos animais do G2 aos 21 dpi nos suabes nasais. O desvio padrão aparece com um grande intervalo, devido alta variabilidade dos dados e a inserção do valor zero para os animais considerados negativos. O maior intervalo observado nos suabes nasais em ambos os grupos e nos suabes fecais do G1 aos 21 dias, teve interferência do número de animais negativos que foi de 2, 1 e 1, respectivamente.

Figura 8 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas amostras de suabes nasais e fecais do G1 e G2.



4.2.2.3 Tecidos

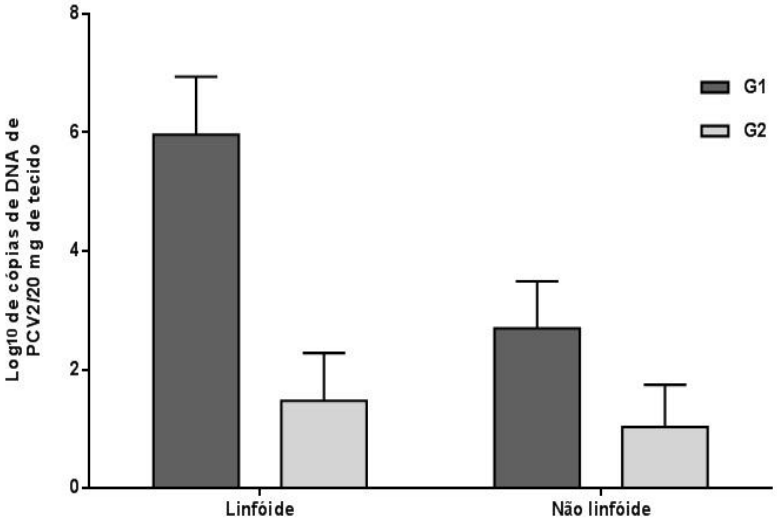
O DNA viral do PCV2 foi encontrado em quase todos os órgãos do animal 722 do G1, exceto no fígado. Nos outros dois animais (727 e 729), o DNA viral foi encontrado nos linfonodos (mesentérico, mediastínico e inguinal) e no pulmão. A

carga viral variou de $1,63x10^4$ a $2,71x10^9$ cópias de DNA viral/20 mg de tecido, sendo a maior carga observada no linfonodo mediastino do animal 727 (Apêndice J).

Em apenas um animal do G2 (738) foi detectado a presença de DNA viral nos tecidos, como baço, linfonodos inguinal e mediastínico, fígado, pulmão e íleo, com variação da carga viral entre $3,77 \times 10^1$ a $2,86 \times 10^9$ cópias de DNA viral/20 mg de tecido.

A média e desvio padrão da carga viral de PCV2 dos tecidos linfóides e não linfóides de cada grupo encontram-se na figura 9. A carga viral variou de $3,77x10^1$ a $7,58x10^8$ e de $9,46x10^1$ a $2,86x10^9$ cópias de DNA viral/20 mg de tecido no tecidos não linfóides e linfóides, respectivamente. A maior média de carga viral foi observada nos órgãos linfóides de ambos os grupos. O desvio padrão aparece com um grande intervalo, devido alta variabilidade dos dados e a inserção do valor zero para os animais considerados negativos.

Figura 9 - Gráfico de média e desvio padrão da carga viral de PCV2 encontrada nas amostras de tecidos do G1 e G2



4.2.3 Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos

As sequências, do inóculo (Isolado_9) e de uma amostra que corresponde a quatorze passagens anteriores a do inoculo utilizado (Isolado_8), foram alinhadas com outras 140 sequências de PCV2 disponíveis no GenBank. Através dessa

análise, foram observadas duas substituições de nucleotídeos (Tabela 4), que não foram verificadas em nenhuma das sequências do GenBank analisadas. Ambas as mutações foram sinônimas, ou seja, sem substituição de aminoácidos. Essas mutações foram utilizadas como um marcador do isolado brasileiro para confirmar a infecção e transmissão nos animais.

Tabela 4 - Códons e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeo (sublinhado) nas sequências entre o inóculo e as recuperadas dos suínos infectados com PCV2

Posição do códon*	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
859	GTT → GTC	Transição	Não teve
1288	CTC → CTT	Transição	Não teve

*Posição do nucleotídeo que inicia o códon.

Do total do genoma do PCV2, foram obtidos 1520 nt das amostras de tecidos linfóides dos animais do experimento, sendo quatro amostras do G1 (uma amostra do animal 722, uma do animal 729 e duas do animal 727) e duas do G2 (amostras do animal 738). A matriz de identidade entre a sequência do inóculo utilizado (Isolado_9) e as obtidas nas amostras dos animais do experimento variou de 99,7 a 100 % (Apendice M).

As sequências obtidas das amostras dos tecidos dos animais, também, foram alinhadas com as mesmas 140 sequências de PCV2 do Genbank utilizadas na análise do inóculo. As localizações das mutações nas posições 859 e 1288 estão demonstradas nas figuras 2 e 3 (Apêndices N e O) em apenas 50 sequências, que foram selecionadas por representar a diversidade entre os genótipos de PCV2.

Observou-se que a mutação que ocorreu na décima quarta passagem do isolado brasileiro (sequência Isolado_8) no códon 859, ausente no inóculo (sequência Isolado_9), foi observada nas sequências extraídas das amostras dos animais do experimento, inclusive no animal do grupo contactante (Apêndice N).

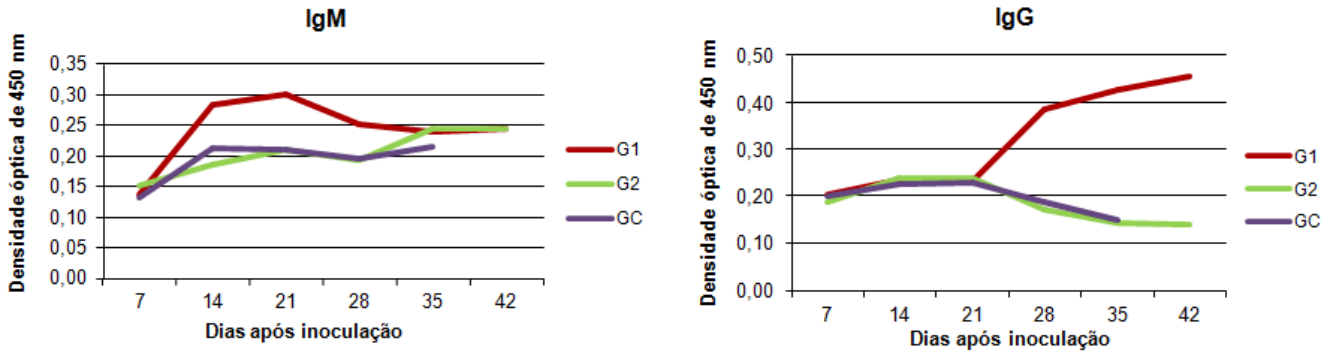
A mutação observada no códon 1288 foi observada em ambas as sequências das passagens do isolado brasileiro (sequência Isolado_8 e sequência

Isolado_9) e nas amostras dos animais, incluindo o animal do grupo contactante (Apêndice O).

4.2.4 ELISA

Semanalmente, após a inoculação, foram realizados ELISAs para detecção de IgG e IgM anti-PCV2 nos animais dos três grupos. Os níveis de IgG permaneceram baixos depois da inoculação, mantendo-se assim até o 28 dpi. Aos 35 dpi e 42 dpi, um (722) e dois (722 e 729) animais do G1, respectivamente, apresentaram aumento dos títulos de IgG, não sendo o suficiente para demonstrar a ocorrência de uma soroconversão (Figura 10 e Apêndice F). Durante o período experimental (0 aos 42 dpi) nenhum animal foi positivo para IgM conforme demonstrado na figura 10 e apêndice F (planilha com os dados do período).

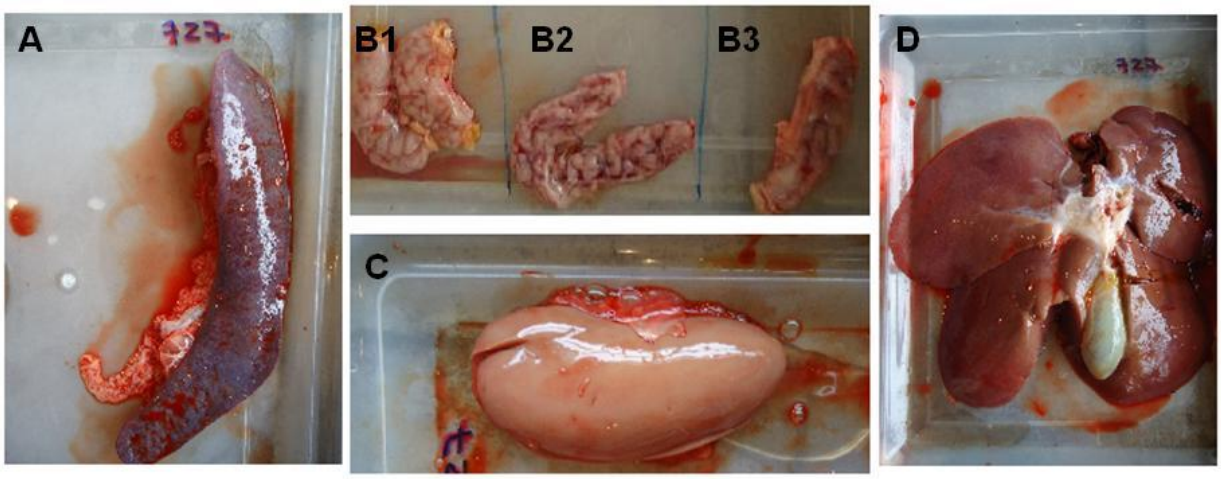
Figura 10 - Média por grupo, das leituras de densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovirus IgG/IgM) para IgG e IgM anti-PCV2 no soro dos leitões durante o período após a inoculação



4.2.5 Achados anatomopatológicos

Nenhuma lesão macroscópica, característica de infecção por PCV2, foi observada no fígado, baço, rim e intestinos dos animais inoculados e contactantes (Figura 11). Não foi observada lesão ou alteração anatômica nos seios nasais, coração e estômago.

Figura 11 - Aspectos dos órgãos do animal 727 do G1 demonstrando ausência de alterações anatomopatológicas durante a necropsia



* A= Baço; B1 = Duodeno; B2 = Jejuno; B3 = Íleo; C= Rim; D = Fígado

Os linfonodos permaneceram normais a ligeiramente aumentados na maioria dos animais de ambos os grupos. Os pulmões apresentaram-se não colapsados, sem regiões hemorrágicas ou necróticas (Figura 12).

Figura 12 - Aspecto do pulmão do animal 727 do G1 com ausência de regiões hemorrágicas, necróticas e não colapsados

4.2.6 **HE e IHC**

Nenhuma alteração microscópica característica de infecção por PCV2 foi observada nos tecidos linfóides (baço, linfonodos mesentéricos, mediastinico e inguinais) dos animais do G1 e G2 (Figura 13 e Apêndice L).

No pulmão dos animais 722 e 729 do G1 foi observada pneumonia intersticial moderada difusa com infiltrado linfohistioplasmocítico perivascular e periobronquial. No fígado do animal 729 foi observado infiltrado perivascular linfocítico focal moderado. No entanto, nenhuma das lesões são características de PCVAD quando há ausência do antígeno viral (IHC negativo).

Dentre os animais não inoculados contactantes (721, 737 e 738) foi observado pneumonia intersticial leve a moderada com infiltrado de neutrófilos e macrófagos no interior de brônquios e bronquíolos, e hiperplasia moderada de tecido linfóide associado aos brônquios. Essas lesões, também, não são características de PCVAD quando há ausência do antígeno viral (IHC negativo).

Nenhum órgão testado por IHC (baço, linfonodo mesentérico, linfonodo mediastínico, linfonodo inguinal), dos animais de G1 e G2, apresentou marcação específica para PCV2 (Figura 14).

Figura 13 - Baço de suíno sem alteração: Folículo linfóide (A) com arteríola centrofolicular (seta), polpa vermelha (B) e trabécula (C). Coloração de hematoxilina e eosina, 100x

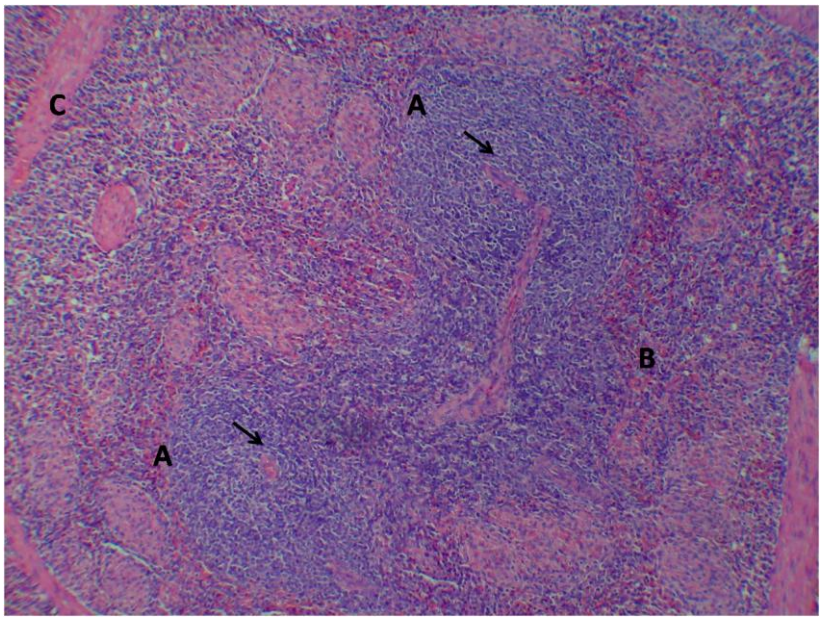
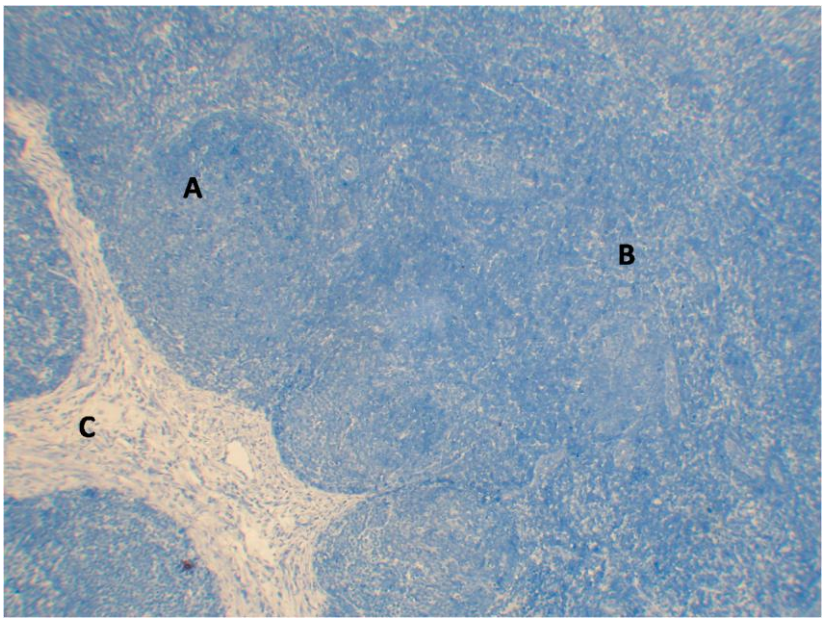


Figura 14 - Linfonodo de suíno negativo para a técnica de imuno-histoquímica para PCV2 contra corado com hematoxilina. Região cortical com os folículos linfóides (A), tecido linfóide difuso (B) e seios corticais (C), 100x



5 DISCUSSÃO

O PCV2 é ubíquo na população de suínos, com uma elevada porcentagem de animais infectados clinicamente saudáveis. Por essa razão, o diagnóstico individual de PCVAD é baseado na presença de lesões microscópicas associadas a antígenos ou ácidos nucleicos do PCV2 através de imunohistoquímica (IHC) ou hibridação in situ (OPRIESSNIG et al., 2007).

O isolamento viral não é feito rotineiramente, por ser demorado e nem sempre eficaz. Diante das dificuldades de isolamento do PCV2 em culturas de células, associado à necessidade de comprovação da detecção do antígeno viral, tem-se priorizado estudos conduzidos com outros métodos de diagnósticos que visam à detecção de antígenos ou DNA viral (McNEILLY et al., 1999; ALLAN; ELLIS, 2000; PROGRANICHNYY et al., 2000; HAMEL et al., 2000; ZANELLA, 2005).

A PCR quantitativa tem sido utilizada para identificar infecção por PCV2 nos animais, sendo uma ferramenta valiosa para a detecção precisa e quantitativa de DNA viral nas amostras de soro, tecido e secreções (OPRIESSNIG et al., 2007). No estudo realizado por McIntosh et al. (2009), a técnica quantitativa permitiu ainda diferenciar infecção clínica e subclínica. Os autores relataram uma maior carga de DNA de PCV2 nos leitões acometidos pela PCVAD (infecção clínica) do que nos animais com infecção subclínica (ROVIRA et al., 2002; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002; BRUNBORG et al., 2004; SEGALÉS et al., 2005a).

No entanto, com a alta disseminação de PCV2 nos rebanhos, a utilização de PCR quantitativa no diagnóstico de PCVAD, deve seguir alguns critérios, conforme mostram os diferentes estudos.

Brunborg et al. (2004) compararam a carga viral detectada em amostras de linfonodos mesentéricos e nos soros de animais infectados naturalmente com e sem PCVAD. Os autores relataram carga viral de 10^6 e 10^7 cópias de DNA viral/mL de soro ou 500 ng de tecido em animais sem e com PCVAD, respectivamente.

Esse trabalho colaborou para a padronização do uso da PCRq no diagnóstico de PCVAD preconizada na revisão publicada por Opriessnig et al. (2007). Os autores alertaram para a sensibilidade da PCR quantitativa na detecção de PCV2 e propuseram que o diagnóstico de PCVAD, por PCRq, deve-se seguir os

seguintes parâmetros: i) negativo para PCV2 e PCVAD; ii) positivo para PCV2 e negativo para PCVAD com carga viral < 10^6 (infectado pelo PCV2, com ausência de sinais e lesões características de PCVAD); iii) positivo para PCV2 e sugestivo de PCVAD com carga viral de 10^6 (infectado pelo PCV2, com sinais e lesões sugestivos de PCVAD) e vi) positivo para PCV2 e PCVAD, com carga viral >10^7 (infectado pelo PCV2 com presença de sinais e lesões características de PCVAD). Por essa razão tornou-se mais desejável a utilização de métodos de quantificação para determinar a magnitude da infecção por PCV2.

A PCR quantitativa empregada neste estudo utilizou o sistema de detecção baseado nos corantes que se intercalam nas duplas-fitas de DNA, como o SYBR® Green. Esse sistema, conjuntamente com os *primers* descritos no item 3.5.3, amplificou um fragmento de 145 pb da ORF2. Esse produto permite uma amplificação eficiente segundo Giulietti et al. (2001), que recomendam produtos de 50 a 150 pb. Adicionalmente, esses *primers* foram analisados no BLAST e demonstraram ser específicos para o PCV2, permitindo a detecção de PCV2a e PCV2b não amplificando outros vírus comumente detectados em co-infecções (PPV, TTV1 e TTV2) (dados não apresentados).

O sistema de detecção baseado no SYBR® Green foi escolhido por possibilitar a sua utilização com diferentes *primers* (para PCV2 e outros agentes como TTSuV1 e TTSuV2 em futuros trabalhos), menor custo para aplicação da técnica e maior sensibilidade quando comparada com sondas do sistema ‘TaqMan”. Além disso, permite a análise da curva de dissociação indicando a especificidade analítica do teste, evitando erros de análise, discriminando tamanhos de *amplicons* de dímeros de *primers* (YANG et al., 2007).

Para realização da análise quantitativa, para a exata quantificação do DNA utilizando o SYBR® Green, fez-se necessário o uso de uma curva de calibração externa baseada em DNA recombinante com a sequência alvo. Foi utilizado um plasmídeo recombinante com a sequência correspondente a ORF2 do PCV2 (145pb). A presença do inserto foi confirmada tanto por PCR, quanto pelo sequenciamento.

A sensibilidade do SYBR® Green foi determinada a partir da construção da curva padrão, através das diluições seriadas na base 10 do plasmídeo recombinante. As curvas de amplificação das diluições escolhidas estavam entre os

ciclos (Ct) 18 (para $9,7x10^5$ cópias) e 31,6 (para $9,7x10^1$ cópias), onde mantiveram seus ângulos, indicando boa eficiência de reação. Um coeficiente de correlação satisfatório (R^2) igual a 0,998 foi obtido entre o número de cópias das diluições e os valores de Ct para as cinco diluições empregadas (10^{-3} a 10^{-7}), com um slope de -3,3 e uma eficiência de 99,9%, não havendo amplificação dos controles negativos. Além disso, a curva de *Melt* exibiu um único pico com temperatura de *Melt* (*Tm*) de 78,26°C. Portanto, as amostras que apresentaram um *Ct* < 30 e valores de *Tm* próximo ao exibido pela curva padrão foram consideradas positivas (CAVALCANTI, 2008).

Observou-se homogeneidade entre as duplicatas, demonstrando que a padronização da PCRq atendeu as expectativas da técnica, pois segundo Solano-Gallego et al. (2007) e Cavalcanti (2008), a técnica de PCR quantitativa é altamente precisa.

Em relação à qualidade da amostra, a mesma foi verificada por meio de PCR para alvos constitutivos da célula, como por exemplo, os genes da β-actina, β-globina e albumina (MARY et al., 2004; GILSBACH et al., 2006; KOMPALIC-CRISTO et al., 2007). Em nosso estudo, a utilização da PCR para β-actina confirmou a ausência de inibidores e falhas de extração (HOORFAR et al., 2004). Desta maneira, as amostras extraídas do experimento foram submetidas à PCRq.

O isolado brasileiro testado pela PCR foi negativo para os seguintes agentes: PPV, *B. bronchiseptica, P. multocida* e *M. hyopneumoniae*. As co-infecções estão envolvidas na diversidade de manifestações clínicas resultantes das associações intrínsecas do PCV2 com outros agentes como vírus (PPV e PRRS) e bactérias (*M. hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica* e *P. multocida*). Segundo Gillespie et al. (2009), a co-infecção do PCV2 com outros agentes aumenta a incidência da PVCAD e implica na ocorrência de sinais clínicos mais severos durante o curso da doença. Por essa razão, a presença de algum desses co-agentes poderia interferir nos resultados deste experimento.

Para dar início a infecção experimental, os animais foram monitorados para avaliar a queda de anticorpos maternos, uma vez que anticorpos passivos adquiridos conferem proteção contra infecções virais para leitões recém-nascidos, dependendo do título circulante nesses animais. Opriessnig et al. (2004) demontraram uma correlação direta entre o título de anticorpos no colostro da porca

e título de anticorpos da sua leitegada, sendo que porcas com maior quantidade de anticorpos no soro resultaram em leitões com maior títulos de anticorpos, que decaíram durante um longo período de tempo. Mckeown et al. (2005) observaram que o nível de anticorpos maternos para PCV2 é um importante determinante na resposta de um leitão à infecção pelo agente, pois quanto maior os níveis de anticorpos maternos, maior proteção os leitões terão.

Diante da queda da imunidade passiva, observada apenas aos 49 dias de idade, os animais do G1 foram inoculados. Essa demora era esperada, uma vez que leitões oriundos de porcas PCV2-IgG positivas, apresentam queda dos anticorpos, atingindo níveis considerados negativos, entre quatro e 12 semanas de idade. A soroconversão nesses leitões, dependendo dos níveis de anticorpos passivos, pode ocorrer após 10 semanas de idade (OPRIESSNIG et al., 2004; GERBER et al., 2011). Adicionalmente a queda de anticorpos, a ausência de viremia aos 49 dias de idade confirmou que os animais não se infectaram durante a permanência na granja.

No entanto, apesar dos anticorpos maternos conferirem proteção, evitando a mortalidade e desenvolvimento de sinais clínicos, não é capaz de evitar a infecção nos leitões pelo PCV2, podendo resultar em uma soroconversão tardia (McKEOWN et al., 2005; GERBER et al., 2011). Por essa razão, os três animais do grupo controle, permaneceram na unidade e foram monitorados até 140 dias de idade. A ausência de soroconversão e DNA no soro fortaleceram a ausência de infecção dos animais durante a gestação e após o nascimento.

Diariamente foi realizada a inspeção geral nos animais para acompanhar dados referentes às manifestações clínicas e avaliar o desenvolvimento adequado dos mesmos, onde não foram observados sinais clínicos característicos de PCVAD.

Apenas três animais dos grupos G1/G2 apresentaram discretas alterações das fezes (pastosas) na segunda semana após a inoculação, não sendo observada nenhuma alteração após esse período. Essas alterações gastrointestinais podem estar relacionadas com a mudança de ambiente e consequentemente da temperatura do galpão (mais quente devido à utilização de cama sobreposta) e a introdução da nova ração indicada para a fase animal, com início aos 49 dias (BERSANO, 2009).

Em relação aos quadros respiratórios apenas quatro animais dos grupos G1/G2 apresentaram alteração da respiração, com dispnéia leve a moderada, sendo observado alguns quadros de taquipnéia aos 21 e 28 dpi. Apenas um animal do G2 (738) apresentou moderada dispnéia durante essas duas semanas, com progressiva melhora na semana seguinte. As manifestações de tosse foram progressivas em relação ao grau de severidade no decorrer do experimento, em todos os animais G1/G2. Provavelmente essas alterações estejam relacionadas ao efeito físico, da cama de maravalha, exercido sobre o aparelho respiratório superior dos suínos.

Em estudo realizado pela EMBRAPA Suínos e Aves, onde avaliaram a respiração dos suínos em diferentes tipos de cama, os animais criados sobre cama de serragem e maravalha foram os que apresentaram porcentagem de espirro e tosse mais elevada devido a maior quantidade de partículas em suspensão no ar (MORÉS, 2000). Em estudo anterior, Hoy e Stehmann (1994), observaram maior ocorrência de pleurite e pleuropneumonia nos suínos criados sobre cama de maravalha sobreposta, em comparação com aqueles em piso metálico totalmente ripado.

Não houve aparecimento de sinais clínicos relacionados a distúrbios do sistema nervoso e nem de pele. As mucosas dos animais permaneceram róseas durante todo o experimento.

O desenvolvimento de sinais clínicos em animais infectados apenas com PCV2 ainda é muito controverso. Kixmoller et al. (2008) infectaram experimentalmente leitões com aproximadamente 27 dias de vida, observando que, após o início da viremia (10 a 26 semanas de idade), o sinal clínico predominante foi a tosse. Uma proporção considerável de animais mostraram sinais de palidez e letargia, enquanto que os sinais de diarréia e claudicação foram menos proeminentes.

Por outro lado, autores confirmaram que é difícil reproduzir manifestações clínicas de PCVAD em condições experimentais, mesmo utilizando animais desprovidos de colostro e soro-negativos (ALLAN et al., 2000; BOLIN et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2003).

Resultados semelhantes foram observados por Ostanello et al. (2005) que não observaram desenvolvimento de sinais clínicos durante o experimento com

animais experimentalmente infectados aos 21 dias de vida. Allan et al. (2007), também, não observaram desenvolvimento de sinais clínicos característicos de PCVAD em leitões experimentalmente infectados aos 35 dias de vida.

Portanto, a ausência de sinais clínicos observados no presente estudo, foi relatada por outros autores em condições semelhantes (ALLAN et al., 2000; BOLIN et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2003; OSTANELLO et al., 2005; ALLAN et al., 2007), fortalecendo a hipótese da necessidade de co-fatores para o desenvolvimento de PCVAD.

O DNA viral do PCV2 foi recuperado em quase todos os órgãos dos animais do G1, sendo mais frequente nos órgãos linfóides. No soro sua detecção foi possível a partir do 21° dpi, com variação na persistência entre os animais (21° a 42° dpi). Nos suabes fecais e nasais dos animais desse grupo o DNA viral foi encontrado aos 21 dpi em dois animais e em um animal, respectivamente, sem grandes variações na carga viral encontrada.

A detecção de DNA de PCV2 em secreções anteriormente a sua detecção no soro pode ser um resíduo do inóculo que contaminou o ambiente, por uma reação do próprio animal após a inoculação. Pode ser ainda, o inóculo que foi ingerido durante a inoculação, o qual foi posteriormente eliminado nas fezes. Ressalta-se que as quantidades detectadas não foram maiores que 10^6, portanto abaixo da quantidade detectada em animais infectados naturalmente (PATTERSON et al., 2011).

Resultados semelhantes foram observados por Capriolli et al. (2006). Os autores detectaram DNA do PCV2 em suabes fecais e tonsilares aos 6 dpi, de animais inoculados via oronasal com quatro semanas de idade, não sendo detectado no soro até 9 dpi. Os autores concluíram que o DNA viral detectado ao 6° dpi nos suabes nasal e tonsilar era o inóculo.

Sibila et al. (2004), também, detectaram PCV2 nas cavidades nasais em leitões sem viremia. Os autores sugeriram que o DNA viral detectado nas secreções nasais seria resultado da contaminação ambiental por PCV2 não sendo, portanto, a eliminação desencadeada por uma infecção do animal.

Além dos resultados semelhantes observados por outros estudos, os resultados descritos por Andraud et al. (2008), fortalecem essa possibilidade. Os

autores demonstraram que o tempo médio necessário para um animal recentemente infectado infectar outro animal susceptível é de aproximadamente 18 dias em contato na mesma baia.

Somente em um animal do grupo contactante foi recuperado DNA de PCV2 nos tecidos, sendo o único a entrar em viremia até o fim do acompanhamento. Esse resultado demonstrou a transmissão horizontal, confirmando a necessidade de tempo maior que 18 dias observada por Andraud et al. (2008).

Considerando a padronização para o uso da PCR quantitativa na detecção de PCV2, animais que apresentam carga viral média abaixo de 10^6 cópias de DNA viral são negativos para PCVAD. Portanto, três animais do G1 e um animal do G2 desencadearam uma infecção subclínica (OPRIESSNIG et al., 2007).

As maiores cargas virais encontradas por quantificação do PCV2, em ambos os grupos, foram nos tecidos linfóides. Técnicas como a ISH demonstraram haver grandes quantidades de ácidos nucléicos do PCV2 no citoplasma de macrófagos e células dendríticas em tecidos linfóides. Sua persistência de longa duração no interior dessas células tem sido apontada como um mecanismo potencial de disseminação para o PCV2 por meio do organismo (VINCENT et al., 2003; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

Portanto, a ausência de viremia anterior à detecção de DNA viral nos órgãos observada nesse experimento pode ser resultado da disseminação viral utilizando macrófagos e células dendríticas.

No presente estudo, o sequenciamento do isolado brasileiro utilizado como inóculo e de uma amostra que corresponde a décima quarta passagem, anterior a do inóculo utilizado, permitiu sua comparação por meio do alinhamento múltiplo das sequências de PCV2 disponíveis no banco de dados de domínio público. Esse alinhamento apontou mutações pontuais, que apesar de estarem presentes no inóculo não foram observadas em nenhuma das 140 sequências utilizadas no alinhamento. Portanto, essas mutações foram usadas como marcadores.

O sequenciamento do DNA de PCV2 recuperado nas amostras dos animais inoculados e no único animal contactante permitiu comparar essas sequências com a sequência do inóculo apresentando identidade nucleotídica entre 99,7 e 100%.

Semanalmente, após a inoculação, foram realizados os ELISAs dos nove

animais para monitorar a infecção. Os níveis de IgG permaneceram próximos a 0,3 após a inoculação, mantendo-se assim até o 28 dpi, onde apenas dois animais do G1 apresentam aumento, não sendo o suficiente para demonstrar a ocorrência de uma soroconversão. Nenhum animal foi positivo para IgM aos 42 dpi.

A maioria dos animais infectados experimentalmente com PCV2 por Opriessnig et al. (2006a), soroconverteram entre 21 e 35 dpi. A idade do animal e níveis de anticorpos maternos no momento da inoculação, a dose viral, a cepa viral escolhida para o desafio, e a sensibilidade do ensaio utilizado podem influenciar na soroconversão.

A ausência de soroconversão pode estar relacionada a baixa carga viral encontrada nos soros dos animais (Apêndice K). Carasova et al. (2007) relataram que a viremia e a subsequente resposta imune em um rebanho de suínos, estão diretamente relacionados, onde o aumento na produção de anticorpos correspondeu à estimulação do sistema imunológico através da replicação do PCV2. Segundo Steiner et al. (2009), a infecção subclínica por PCV2 está relacionada com a lenta produção de anticorpos e fraca resposta de células T.

Alguns autores observaram que a soroconversão em suínos convencionais, SPF e CDCD infectados experimentalmente com PCV2 ocorre tipicamente entre 14 e 21 dpi (PROGRANICHNYY et al., 2000; BOLIN et al., 2001; MEERTS et al., 2005). Gauber et al. (2011) em seu experimento de infecção experimental, utilizando suínos gnotobióticos, onde avaliaram diferentes doses de desafio (baixa, média e alta) sobre a patogenicidade do PCV2a e PCV2b, observaram que apenas 6/28 animais soroconverteram no fim do experimento (entre 26 a 41 dpi), e que 4 desses 6 animais pertenciam ao grupo de desafio com alta dose.

Ramammorthy et al. (2011) inocularam suínos convencionais com PCV2-selvagem e PCV2-mutante, onde foi identificado na origem de replicação do seu genoma uma sequência de elementos de resposta interferon-estimulante (ISRE, do inglês *interferonstimulated response element*). Observaram que a mutação da sequência de ISRE claramente causou um retardo na resposta de anticorpos PCV2. Acredita-se, que o baixo nível de replicação do vírus resultou na baixa produção de anticorpos.

Portanto, ausência de soroconverão observada no experimento pode ser resultado da baixa carga viral observada no soro, da mutação pontual observada no isolado brasileiro utilizado como inóculo e/ou da alta carga viral encontrada nos tecidos linfóides, uma vez que o vírus pode regular a atividade das células apresentadoras de antígenos, diminuindo a resposta de anticorpos (VINCENT et al., 2003).

Não foi observada nenhuma lesão macroscópica ou alteração anatômica significativa nos órgãos avaliados durante a necropsia aos 42 dpi em ambos os grupos.

Allan et al. (2007) não observaram alterações anatomopatológicas características de PCVAD em leitões experimentalmente infectados aos 35 dias de vida. Opriessnig et al. (2008b) também relataram a ausência de alteração macroscópica em suínos inoculados com PCV2 aos 28 dias de idades.

Nenhuma alteração foi observada nos tecidos linfóides avaliados através do exame de hematoxilina-eosina em ambos os grupos, apenas alterações nos pulmões, como pneumonia intersticial leve a moderada em quatro animais e hiperplasia de tecidos linfóides em um animal, onde em somente dois destes foi detectado o DNA do PCV2 pela PCRq. No fígado de um animal do G1, negativo pela PCRq, foi observado infiltrado perivascular linfocítico focal moderado.

No caso da pneumonia intersticial, enfermidades como síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), até onde se sabe exótica no Brasil, influenza suína e a Doença de Aujeszky poderiam induzir lesões semelhantes e a hiperplasia intersticial é também comum em casos de infecção por *M. hyopneumoniae* (IRIGOYEN, et al., 1998; BARCELLOS, 2005; SOUZA, LOBATO e GUEDES, 2008). Após a infecção experimental os animais não foram testados para esses outros agentes.

Através da IHC também não foi observada nenhuma lesão característica de PCVAD. Apesar da alta carga viral encontrada nos tecidos através da PCRq, não foram encontrados antígenos PCV2 em baço e linfonodos dos animais de ambos os grupos ($>10^8$ e $<10^9$), sendo negativos para IHC (Apêndice L). Essa discrepância pode estar relacionada à sensibilidade do teste, pois segundo Brunborg et al. (2004) são necessárias cargas superiores a 10^8 para que a coloração por IHC seja visível.

Hansen et al. (2010) avaliaram o valor diagnóstico de ambas as técnicas em amostras de coração de fetos, de uma granja dinamarquesa, devido ao aumento no número de mumificados e natimortos. Observaram que todos os fetos IHC positivos para PCV2 apresentaram valores de PCRq acima de 10^8 cópias de DNA por 500 ng. Com base nesse e outros achados, concluíram que a detecção de antígeno PCV2 através da IHC parece ser útil no diagnóstico de doença aguda, enquanto a detecção de DNA viral pela PCRq é um método sensível de diagnóstico, sendo útil para qualquer momento da infecção.

Através do acompanhamento sorológico dos animais que compuseram o experimento, verificamos que até o momento da eutanásia, os animais não haviam soroconvertido, apesar dos resultados da PCRq dos soros e órgãos confirmarem a infecção. Adicionalmente, os animais não apresentaram manifestações clínicas e nem lesões histopatológicas características de PCVAD, demonstrando que a infecção experimental resultou em manifestação subclínica de PCV2. Portanto, o isolado de PCV2b utilizado na inoculação dos animais foi capaz de infectar e se replicar, no entanto não houve tempo para desencadear a soroconversão nesses animais. A transmissão desses animais inoculados para os contactantes, apesar de ter sido baixa, foi demonstrada.

Vários fatores podem ter contribuído no desencadeamento desses resultados, podendo ter sido consequência da idade dos animais no momento da inoculação (49 dias), via de inoculação e dose, inóculo e ausência de co-agentes.

Um estudo de meta-análise de 44 trabalhos sobre infecção experimental publicados até 2007, realizado por Tomás et al. (2008) constataram que a inoculação de suínos até a terceira semana de vida parece ser uma característica comum a todos os experimentos bem sucedidos, onde houve reprodução de sinais clínicos característicos de PCVAD em pelo menos um dos animais inoculados. Nenhum dos experimentos com inoculação em suínos com mais de cinco semanas de idade conseguiu reproduzir a doença em porcentagem adequada. Relacionaram isso ao fato do animal ingerir o colostro por maior tempo e adquirir maior quantia de anticorpos maternos. Entretanto, Opriessnig et al. (2008b), não observaram manifestações clínicas e alterações anatomopatológicas em suínos inoculados com quatro semanas de idade.

Ainda no estudo de Tomás et al. (2008), observaram que a via de inoculação pareceu não ser relevante, uma vez que a maior parte das infecções experimentais foi realizada pela via intra ou oronasal, principal via de transmissão do PCV2.

No entanto, vários autores obtiveram sucesso no desencadeamento da PCVAD através de dupla inoculação, utilizando as vias intranasal e intramuscular. Esse procedimento foi realizado para assegurar que todos os animais fossem infectados no mesmo momento e com doses similares, o que não é garantido por via intranasal apenas, pois os porcos podem espirrar durante o procedimento de inoculação (FENAUX et al., 2004b; OPRIESSNIG, et al., 2010).

Roca et al. (2004), avaliaram diferentes vias de inoculação (intranasal, intramuscular e intraperitoneal) em três grupos de animais. A via intraperitoneal foi utilizada por representar ser uma forma mais direta para o inóculo atingir os gânglios linfáticos, entretanto apresentou ser tão eficaz ou até mais que a via intramuscular em termos de infecção com base nos resultados sorológicos e de PCRq, mas não demonstrou nenhuma diferença quando comparada com a via intranasal.

A baixa transmissão de PCV2 entre os animais inoculados e contactantes pode estar relacionada à baixa carga viral observada na secreção nasal e fezes e a baixa eficiência para desencadear infecção somente pela via intranasal. Resultados semelhantes foram observados por Opriessnig et al. (2012b). Os autores relataram ausência de transmissão de PCV2 entre os animais inoculados e contactantes após 168 dias da inoculação. A diferença observada entre os dois experimentos, Opriessnig et al. (2012b) e o presente, está no fato de que no presente experimento os animais permaneceram o tempo todo com os animais inoculados e na mesma baia.

Grasland et al. (2012) utilizaram um plasmídeo contendo duas cópias do DNA genômico do PCV2 para inocular leitões, a fim de comparar os resultados entre as vias intratraqueal, oronasal e intramuscular. Os autores observaram que a via intramuscular pareceu ser mais eficaz em relação à resposta humoral contra PCV2. Entretanto todas as vias permitiram a produção de partículas infecciosas e a replicação do vírus em todo o corpo.

O genótipo do vírus utilizado para inocular os animais pode ter colaborado para o desencadeamento da infecção subclínica de PCV2 no presente trabalho.

Opriessnig et al. (2006b) realizaram um experimento com dois isolados de PCV2, demonstrando que esses eram diferentes na genética e na virulência, pois um maior número de animais soroconverteram aos 14 dpi quando inculados com o isolado mais virulento.

Além disso, as mutações observadas podem ter conferido ao vírus experiências adaptativas. Fenaux et al. (2004a) demonstraram que, depois de 120 passagens de células em série, o vírus PCV2 original sofreu 2 mutações nucleotidicas, que levou à atenuação da virulência in vivo.

Outro estudo que comprova que as mutações podem alterar a virulência do vírus, foi realizado por Hasslung et al. (2005) que isolaram o vírus de um animal clinicamente saudável e que persistiu muitos anos no rebanho sem causar PCVAD. Os autores observaram cinco alterações nucleotídicas, alegando que as passagens em cultura de células teriam alterado pouco o genoma do S-PCV2. Entretanto em condições experimentais, foi capaz de induzir a doença clínica em suínos de diferentes origens.

Os resultados do estudo realizado por Ramammorthy et al. (2011) sugerem que uma sequência ISRE localizada na origem de replicação do PCV2 desempenhou um papel na indução da patogenia, com um impacto negativo sobre a replicação viral deste vírus. Entretanto a mutação da sequência pareceu diminuir a magnitude das lesões patológicas aos 21 dpi, mas aumentou o tempo de eliminação viral e causou uma infecção mais grave aos 28 dpi, quando comparada ao outro tipo de PCV2 utilizado no experimento.

Além dos fatores citados acima, outros autores (ALLAN et al., 1999; BALASCH et al., 1999; MAGAR et al., 2000) relataram que a infecção por PCV2, não obrigatoriamente, leva os animais a desenvolverem sinais clínicos e vários estudos experimentais, utilizando o PCV2 sozinho, resultaram somente em infecção assintomática com leves a moderadas lesões histopatológicas. Confirmando que a coinfecção com outros patógenos suínos aumenta a severidade da PCVAD (GILLIESPIE et al., 2009; GRAU-ROMA; FRAILE; SEGALÉS, 2011; RAMAMMORTHY et al., 2011, OPRIESSNIG; HALBUR, 2012a; SEGALÉS, 2012).

Este é o primeiro trabalho de infecção experimental realizado com isolado brasileiro, onde foi observada a capacidade de infectividade do mesmo, resultando

na infecção subclínica dos animais. O isolado brasileiro demonstrou ser transmitido pela via horizontal através do contato direto entre os animais inoculados e não inoculados contactantes. Os resultados deste experimento contribuíram para a confirmação de que vários fatores podem influenciar ou interferir no desencadeamento da PCVAD. Além disso, demonstrou que interpretações diferentes devem ser dadas para as diferentes técnicas utilizadas no diagnóstico da PCVAD.

6 CONCLUSÃO

6.1 O isolado brasileiro foi capaz de causar infecção subclínica nos animais infectados experimentalmente;

6.2 A transmissão horizontal do isolado brasileiro de PCV2 aos animais contactantes foi confirmada;

6.3 Devido a ausência de sinais clínicos e histopatológicos característicos de PCVAD nos animais infectados experimentalmente com o isolado brasileiro, não houveram lesões macro e microscópicas a serem descritas;

6.4 Os níveis de anticorpos PCV2 específicos dos animais experimentalmente infectados com o isolado brasileiro não puderam ser avaliados, pois até o momento da eutanásia (42 dpi), os animais não soroconverteram;

REFERÊNCIAS

ALLAN, G. M.; CAPRIOLI, A.; McNAIR, I.; LAGAN-TREGASKIS, P.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; McKILLEN, J.; OSTANELLO, F.; McNEILLY, F. Porcine Circovirus 2 Replication in Colostrum-deprived Piglets Following Experimental Infection and Immune Stimulation Using A Modified Live Vaccine against Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Vírus. **Zoonoses Public Health**, v. 54, p. 214–222, 2007.

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviroses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 12, p. 3–14, 2000.

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 parvovírus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1–11, 1999.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. Immunostimulation PCV2 and PMWS. **Veterinary Record**, v.147, p. 170–171, 2000.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; JOHNSTON, D.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; FOSSUM, C.; WATTRANG, E.; WALLGREN, P. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedshi isolate of PCV2. **Veterinary Record**, v. 150, p. 255-256, 2002.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TOOD, D.; McNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine B,** v. 41, p. 17–26, 1994.

ANDRAUD, M.; GRASLAND, B.; DURAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A.; MADEC, F.; Rose, N. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) within- and between-pen transmission in pigs. **Veterinary Research**, v. 39, p. 43, 2008.

BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Tissue Homogenates from Pigs with Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 139–148, 1999.

BALDIN, C. M.; SANTOS, S. S.; CRUZ, T. F.; OLIVEIRA, C. P.; CASTRO, A. M. M. G.; ARAUJO, JR., J. P.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparação da dinâmica de eliminação de PCV2 nas fezes de camundongos após a infecção experimental na fase adulta e jovem. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALITAS DE SUÍNOS, 15., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, ABRAVES, 2011.

BARCELLOS, D.. Dinâmica da infecção pelo Mycoplasma hyopneumoniae: Uma Visão Atual. Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína, I, 2005, Porto Alegre. **Anais...** Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre , 2005.

BERSANO, J. Diarréia em leitões: como prevenir – Instituto Biológico de São Paulo. Acessado em 17 de junho de 2012. Online. Disponível em: http://www.porkworld.com.br/artigos/post/diarreias-em-leitoes-como-prevenir-_17077. Acesso em 29 mai 2012.

BOLIN, S. R.; STOFFREGEN, W. C.; NAYAR, G. P.; HAMEL, A. L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum- deprived piglets with type 2 porcine circovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 185–194, 2001.

BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, C. M.; 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.

CAPRIOLLI, A.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; LAGAN-TREGASKIS, P.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; McKILLEN, J.; OSTANELLO, F.; ALLAN, G. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 287– 292, 2006.

CARASOVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, K.; TRUNDOVA, M.; MOLINKOVA, D.; LOBOVA, D.; SMOLA, J. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 274–278, 2007.

CASTRO, A. M. M. G., CORTEZ, A., HEINEMANN, M. B.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). **Archives of Virology**, v. 152, p. 1435–1445, 2007.

CAVALCANTI, M. P. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum* em cães**. 2008, 139 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,Recife, 2008.

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

CHAIYAKUL, M.; HSU, K.; DARDARI, R.; MARSHALL, F.; CZUB, M. Cytotoxicity of ORF3 proteins from a nonpathogenic and a pathogenic porcine circovirus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11440–11447, 2010.

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

CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K. S.; VIDIGAL, P. M.; SILVA, F. M.; CASTRO, L. A.; FIETTO, J. L.; SILVA, A. J.; ALMEIDA, M. R. Classification and putative origins of brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Vírus Research**, v. 140, n. 1-2, p. 57-63, 2009.

CHOI, C.; CHAE, C. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology,** v. 121, p. 265–270, 1999.

CHOI, C.; CHAE, C.; CLARK, E. G. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 151-153, 2000.

CLARCK, E. G. Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. In **Proceedings of the Western Canadian Association on Swine**, p. 22-25, Canadá, 1996.

CORTEY, M.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.522–523, 2011.

DENG, Z. B; WANG, N. D.; XU, D. J.; YUAN, A. W.; GE, M.; LUO, W.; XUE, L.Q.; YU, X. L. Viral distribution and lesions in Kumming mice experimentaly infected with porcine circovirus type 2b. **Veterinary Research Communication**, v. 35, p. 181-192, 2011.

DROLET, R.; THIBAULT, S.; D`ALLAIRE, S.; THONSON, J. R.; DONE, S. H. Porcine dermatitis and nephropaty syndrome (PDNS): an overview of the disease. **Swine Health Production**, v. 7, n. 6, p. 283-285, 1999.

DURAN, C. O.; RAMOS-VARA, J.; RENDER, J. A. Porcine dermatitis and nephorpathy 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.

DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BAEKBO, 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.

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

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G.; ELVINGER, F.; MENG, X. J. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the vírus in vivo. **Journal of Virology,** v. 78, p. 3440–13446, 2004a.

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,** v. 78, p. 6297–6303, 2004b.

FERNANDES, L. T.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; SOBESTIANSKY, J.; SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C. Coinfecção experimental de circovirus suíno tipo 2 isolado no Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 1-8, 2006.

FIRTH, C.; MICHAEL, A. C.; DUFFY, S.; SHAPIRO, B.; HOLMES, E. C. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. **Journal of Virology**, p. 12813–12821, 2009.

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. 144, p. 18-23, 2010.

GAUBER, P. C.; LAGER, K. M.; VINCENT, A. L.; OPRIESSNIG, T.; KEHRLI, 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.

GERBER, P. F.; GARROCHO, F. M.; LANA, A. M.; LOBATO, Z. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. **Veterinary Journal,** v. 188, p. 240–242, 2011.

GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. **Journal of Veterinary Internal Medecine**, v. 23, p. 1151–1163, 2009.

GILSBACH, R.; KOUTA, M.; BONISCH, H.; BRUSS, M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real time PCR data. **BioTechniques**, v. 40, p. 173-177, 2006.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GRASLAND, B.; BIGAULT, L.; LE CORVEC, M.; HERNANDEZ-NIGNOL, A.; OGER, A.; DORY, D.; ROSE, N.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Naked PCV-2 cloned genomic DNA is infectious by mucosal (intratracheal or oro-nasal) inoculation. **Vírus Research**, v. 165, p. 90–94, 2012.

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.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. S. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 5262-5267, 1998.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G. P. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 44–52, 2000.

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, n. 1–2, p. 203–209, 2010.

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

HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; 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 vírus. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 528-539, 2001.

HASSLUNG, F.; WALLGREN, P.; LADEKJAER, A. S.;BOTNER, A.; NIELSEN, J.; WATTRANG, E.; ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; TIMMUSK, S.; BELÁK, K.; SEGALL, T.; MELIN, T.; FOSSUM, C. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology,** v. 106, p. 49-60, 2005.

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.

HOY, S.; STEHMANN, R. Hygienische aspekte der tiefstreuhaltung von mastschweinen mit mikrobiell–enzymatischer einstreubehandlung. **Der Praktische Tierarzt**, v. 6, p. 495–504, 1994.

ICT V– International Committee on Taxonomy of Víruses. http://ictvonline.org/vírusTaxonomy.asp?version=2009, acesso em: 18 abr 2012.

IRIGOYEN, L. F.; VAN ALSTINE, W.; TUREK, J.; CLARK, L. Observação ultra-estrutural das vias aéreas de suínos recuperados e suscetíveis após inoculação com Mycoplasmahyopneumoniae. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.18, n.1, p. 1-7, 1998.

JENSEN, T. K.; VIGRE, H.; SVENSMARK, B.; BILLI-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.

KARLSKOV-MORTESEN, P.; KRISTENSEN, C. S.; GRAU-ROMA, L.; BILLE-HANSEN, V.; McNEILLY, F.; JORGENSEN, C .B.; BAEKBO, P.; SEGALÉS, J.; FREDHOLM, M. Closing in on a locus with effect on PMWS susceptibility. In European Conference on Pig Genomics, 2008, Ljublana, Slovenia. **Abstract...**, 2008.

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 parvovírus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 9-24, 2000.

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

KIM, J.; HA, Y.; CHAE, C. Potentiation of porcine circovirus 2-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovírus is associated with excessive production of tumor necrosis factor-alpha. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 5, p. 718-725, 2006.

KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. **Vaccine**, v. 26, p. 3443-3451, 2008.

KOENE, M. G. J.; MULDER, H. A.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; KRUIJIT, L.; SMITS, M. A. Serum protein profiles as potential biomarkers for

Disease in Pigs Infected with Porcine Circovirus-2 (PCV-2). **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 31-42, 2001.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction ofPostweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 andPorcine Parvovírus. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 254–263, 2000.

KRAKOWKA, S.; HARTUNIAN, C.; HAMBERG, A.; SHOUP, D.; RINGS, M.; ZHANG, Y.; ALLAN, G.; ELLIS, J. A. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 12, 2008.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; NIELSEN, J.; STORGAARD, T.; BOTNER, A.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F. Transplacental infection with PCV2 associated with reproductive failure in a gilt. **Veterinary Research**, v. 148, p. 759–760, 2002.

LÓPEZ-SORIA; SEGALÉS, S.; NOFRARÍAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; RAMÍREZ, H.; MÍNGUEZ, A.; SERRANO, J.M.; MARÍN, O.; CALLÉN, A. Genetic influence on the expression of PCV disease. **Veterinary Record**, v. 155, p.504, 2004.

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. **Jornal of Virology,** v. 80, p. 5065–5073, 2006.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine type 2 infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8262-8274, 2005.

LIU, X.; CHEN, L.; SONG, Q.; YANG, F.; LI, Y.; ZUO, Y.; JIOA, J.; WANG, X. Coinfection effects of porcine circovirus type 2 and porcine parvovírus in vivo on phagocytosis and interferon mRNA expression of porcine alveolar macrophages. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 51, n. 1, p. 105-114, 2011.

LORINCZ, M.; CSAGOLA, A.; BIKSI, I.; SZEREDI, L.; DAN, A.; TUBOLY, T. Detection of porcine circovirus in rodents. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 58, p. 265-268, 2010.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNAS, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical

observation from follow up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 223-233, 2000.

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, n. 1, p. 47–65, 2011.

MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAULT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 258–269, 2000.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MANKERTZ, A. Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. **Vírus Research**, v. 164, p. 54– 60, 2012.

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

McINTOSH, K. A.; TUMBER, A.; HARDING, J.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; HILL, J. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 23-33, 2009.

McKEOW, 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.

McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B. M.; FOSTER, J. C.; CLARCKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virological Method**s, v. 80, p.123–128, 1999.

MEERTS, P.; VAN, G. S.; COX, E.; VANDEBOSCH, A.; NAUWYNCK, H. J. Correlation between type of adaptive immune response against Porcine circovirus Type 2 and level of vírus replication. **Viral Immunology,** v. 18, p. 333–341, 2005.

MORANDI, F.; OSTANELLO, F.; FUSARO, L.; BACCI, B.; NIGRELLI, A.; ALBORALI, L.; DOTTORIX, M.; VEZZOLI, F.; BARIGAZZI, G. FIORENTINI, L; SALA, V.; LEOTTI, G.; JOISE, F.; SARLI, G. Immunohistochemical Detection of Aetiological

Agents of Proliferative and Necrotizing Pneumonia in Italian Pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.142, p.74-78, 2010.

MORÉS, N. **Produção de suínos em cama sobreposta (deep bedding): aspectos sanitários**. Seminário Internacional de Suinocultura, 5, 2000. Online. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/publicações, acesso em 17 jun 2012.

MOROZOV, I.; SIRINARUMTR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K.; PAUL, P. S. Detection of novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2535-2541, 1998.

MUHLING, J.; RAYE, W. S.; BUDDLE, J. R.; WILCOX, G. E. Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, p. 421–425, 2006.

OKUDA, Y.; ONO, M.; YAZAWA, S.; SHIBATA, I. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 107–114, 2003.

OLIVEIRA, C. P.; SANTOS, S. S.; CRUZ, T. F; YAMADA, K.; CASTRO, A. M. M. G.; ARAUJO Jr., J. P; BRANDÃO, P. E; RICHTZENHAIN, L. J. Transmissão horizontal de PCV2b em camundongos (CH3/Rockfeller) inoculados experimentalmente aos 21 dias de idade. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALITAS DE SUÍNOS, 15., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, ABRAVES, 2011a.

OLIVEIRA, C. P.; SANTOS, S. S.; CRUZ, T. F; YAMADA, K.; CASTRO, A. M. M. G.; ARAUJO JR., J. P; BRANDÃO, P. E; RICHTZENHAIN, L. J. Transmissão vertical de PCV2 em camundongos (CH3/Rockfeller) inoculados aos 21 dias de idade: um relato. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALITAS DE SUÍNOS, 15., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, ABRAVES, 2011b.

ONUKI, A.; ABE, K; TOGASHI, K.; KAWASHIMA, K.; TANEICHI, A.; TSUNEMITSU, H. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. **Journal of Veterinary Medical Sciense**, v. 61, p.1119–1123, 1999.

OPRIESSNIG, T.; FENAUX, M.; THOMAS, P.; HOOGLAND, M. J.; ROTHSCHILD, M. F.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Evidence of Breed-dependent Differences in Susceptibility to Porcine Circovirus Type–2-associated Disease and Lesions. **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 281–293, 2006a.

OPRIESSNIG, T.; GAUGER, P. C.; FAABERG, K. S.; SHEN, H.; BEACH, N. M.; MENG, X.; WANGA, C.; HALBUR, P. G. Effect of porcine circovirus type 2a or 2b on infection kinetics and pathogenicity of two genetically divergent strains of porcine

reproductive and respiratory syndrome vírus in the conventional pig model. **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 69-81, 2012a.

OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. **Vírus Research**, v. 164, p. 20–32, 2012.

OPRIESSNIG, T.; HEMANN, M.; BEACH, N. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Vaccination with inactivated or live-attenuated chimeric PCV1-2 results in decreased viremia in challengeexposed pigs and may reduce transmission of PCV2. **In: Internacional Pig Veterinary Society Congress**, 22., 2012. Jeju- Coreia, **Anais...**, p.104, 2012b.

OPRIESSNIG, T.; MADSON, D. M.; ROOF, M.; LAYTON, S. M.; RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with Lawsonia intracellularis or Salmonella typhimurium. **Journal of Comparative Pathology,** v. 145, p. 261-270, 2011a.

OPRIESSNIG, T.; MADSON, D. M.; SCHALK, S.; BROCKMEIER, S.; SHEN, H. G.; BEACH, N. M.; MENG, X. J.; BAKER, R. B.; ZANELLA, E. L.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and Mycoplasma hyopneumoniae. **Theriogenology,** v. 76, p. 351–360, 2011b.

OPRIESSNIG, T.; McKEOWN, N. E.; ZHOU, E. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2923–2932, 2006b.

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.; ELSENER, J.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Influence of Maternal Antibodies on Efficacy of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccination To Protect Pigs from Experimental Infection with PCV2. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 397–401, 2008b.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; MADSON, D. M.; PAL, N.; ROTHSCHILD, M.; KUHAR, D.; LUNNEY, J. K.; JUHAN, N. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. **Journal of Animal Science,** v. 87, n. 5, p. 1582-1590, 2009.

OPRIESSNIG, T.; PRICKETT, J.; MADSON, D.; SHEN, H.; JUHAN, N.; POGRANICHNNY, R. M.; MENG, X.; HALBUR, P. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-

infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. **Veterinary Research**, p. 41-31, 2010.

OPRIESSNIG, T.; RAMAMOORTHY, S.; MADSON, D. M.; PATTERSON, A. R.; PAL, N.; CARMAN, S.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2482–2491, 2008a.

OPRIESSNIG, T.; YU, S.; GALLUP, J. M.; EVANS, R. B.; FENAUX, M.; PALLARES, F.; THACKER, E. L.; BROCKUS, C. W.; ACKERMANN, M. R.; THOMAS, P.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 521–529, 2003.

OPRIESSNIG, T.; YU,. S.; THACKER, E. L.; PATRICK, G. H. Derivation of porcine circovirus type 2 negative pigs from positive breeding herds**. Journal of Swine Health and Production,** v. 12, p.186-191, 2004.

OSTANELLO, F., CAPRIOLLI, A., DI, F. A., BATTILANI, M., SALA, G., SARLI, G., MANDRIOLI, L., McNEILY, F., ALLAN, G. M., PROSPERI, S.. Experimental infection of 3-weekold conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovírus. **Veterinary Microbiology,** v. 108, p. 179–186, 2005.

PATTERSON, A. R.; OPRIESSNIG, T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Animal Health Research Reviews, v.** 11, n.2, p. 217–234, 2010.

PATTERSON, A.; RAMAMOORTHY, S.; MADSON, D. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 91–98, 2011.

PROGRANICHNYY, R.M.; YOON, K.J.; HARMS, P.A.; SWENSON, S.L.; ZIMMERMAN, J.J.; SORDEN, S.D. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. **Viral Immunology**, v. 13, p. 143–153, 2000.

RAMAMMORTHY, S.; OPRIESSNIG, T.; PAL, N.; HUANG, F. F.; MENG, X. J. Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome vírus (PRRSV) co-infection model. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 49–58, 2011.

ROCA, M.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; VIAPLANA, E.; URNIZA, A.; HATTERMANN, K.; MANKERTZ, A.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO,

M. In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1259–1266, 2004.

ROSE, N.; OPRIESSNIG, T.; GRASLANDA, B.; JESTIN, A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Vírus Research,** v. 164, p. 78– 89, 2012.

ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURAN, J.; ROSELL, C.; ELLERBROK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO M. Experimental inoculation of conventional pigs conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome vírus and porcine circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3232–3239, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual**.** 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p. 2100.

SAMBROOK, J. ; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. 3 ed. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, S. S.; OLIVEIRA, C. P.; CRUZ, T. F.; YAMADA, K. B.; CASTRO, A. M. M. G.; ARAUJO Jr., J. P.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Dinâmica de eliminação de PCV2 nas fezes de camundongos da linhagem CH3/Rocckfeller após infecção experimental. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALITAS DE SUÍNOS, 15., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, ABRAVES, 2011.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Vírus Research**, v. 164, p. 10– 19, 2012.

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

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, A.; BADIELLA, M.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PVC2) DNA in serum and tonsillar, nasal, traqueo-bronchial, urinary and fecal swabs of pigs with and withot postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v. 11, p. 223-229, 2005a.

SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; ESPUNA, E.; DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **Veterinary Record**¸ v. 142, p. 483–486, 1998.

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 of Veterinary Research**, v. 65, p. 88-92, 2004.

SHEN, H.; WANG, C.; MADSON, D. M.; OPRIESSNIG, T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. **Preventive Veterinary Medecine**, v. 97, n. 3–4, p. 228–236, 2010.

SHIBATA, I.; OKUGA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. The **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 3, p. 405- 408, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUES-CORTES, A.; TROTTA, M.; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 315-319, 2007.

SOUZA, N. N.; LOBATO; Z. I.; GUEDES, R. M. C. Estudo retrospectivo de diagnóstico de circovirose suína pela técnica de imunohistoquimica. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 521-525, 2008.

SINHA, A.; SHEN, H. G.; SCHALK, S.; BEACH, N. M.; HUANG, Y. W.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Porcine reproductive and respiratory syndrome vírus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. **Veterinary Microbiology**, v.152, n.3–4, p. 235–246, 2011.

STEINER, E.; BALMELLI, C.; GERBER, H.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. **Veterinary Research**, v. 5, p. 45, 2009.

TAIRA, O.; OGAWA, H.; NAGÃO, A.; TUCHIYA, K.; NUKOYA, T.; UEDA, S.; Prevalence of swine Torque teno vírus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wastinh syndrome and porcine respiratory disease complex. **Veterinary Microbiology**, v. 18, n. 139, p. 347-50, 2009.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, E. L. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following mycoplasma hyopneumoniae and PRRSV infection in pigs. **Viral Immunology,** v. 16, n. 3, p. 357-367, 2003.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavírus- and picornavírus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentrable Bakteriol Orig A**, v. 226, p. 153–167, 1974.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology,** v. 91, n.3–4, p. 271–276, 1986.

TOMÁS, A.; FERNANDES, L. T.; VALERO, O.; SEGALÉS, J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). Veterinary Microbiology, v. 132, p. 260-273, 2008.

TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 114, p. 146-154, 2003.

TOOD, D.; BENDINELLI, M.; BIAGINI, P.; HINO, S.; MANKERTZ, A.; MISHIRO, S.; NIEL, C.; OKAMOTO, H.; RAIDAL, S.; RITCHIE, B.W.; TEO, G. C. Circoviridae. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Vírus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Víruses**. London: Elsevier/Academic Press, 2005, p. 327–334.

VAN REGENMORETEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M;. BISHOP, D. H. L. **Vírus Taxonomy:** The Classification and Nomenclature of Víruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Víruses. San Diego: Academic Press, 2000, p. 1167.

VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B. M.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH K. C. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the vírus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 288-300, 2003.

WELLERBERG, G. J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F. W.; STEVERINK, P. J.; HUNNEMAN, W.; VANDERVORTS, T. J.; PEPERKAMP, N. H.; OHLINGER, V. F.; SCHIPPERS, R.; VAN OIRSCHOT, J. T.; JONG, M. F. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p.167–172, 2000.

YANG, Z.; HABIB, M.; SHUAI, J.; FANG, W. Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n.3, p.162-169, 2007.

ZANELLA, J. R. Etiologia da síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) e papel do circovírus suíno tipo 2 (PCV2). In: Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína, I, 2005, Porto Alegre. **Anais...** Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre , 2005.

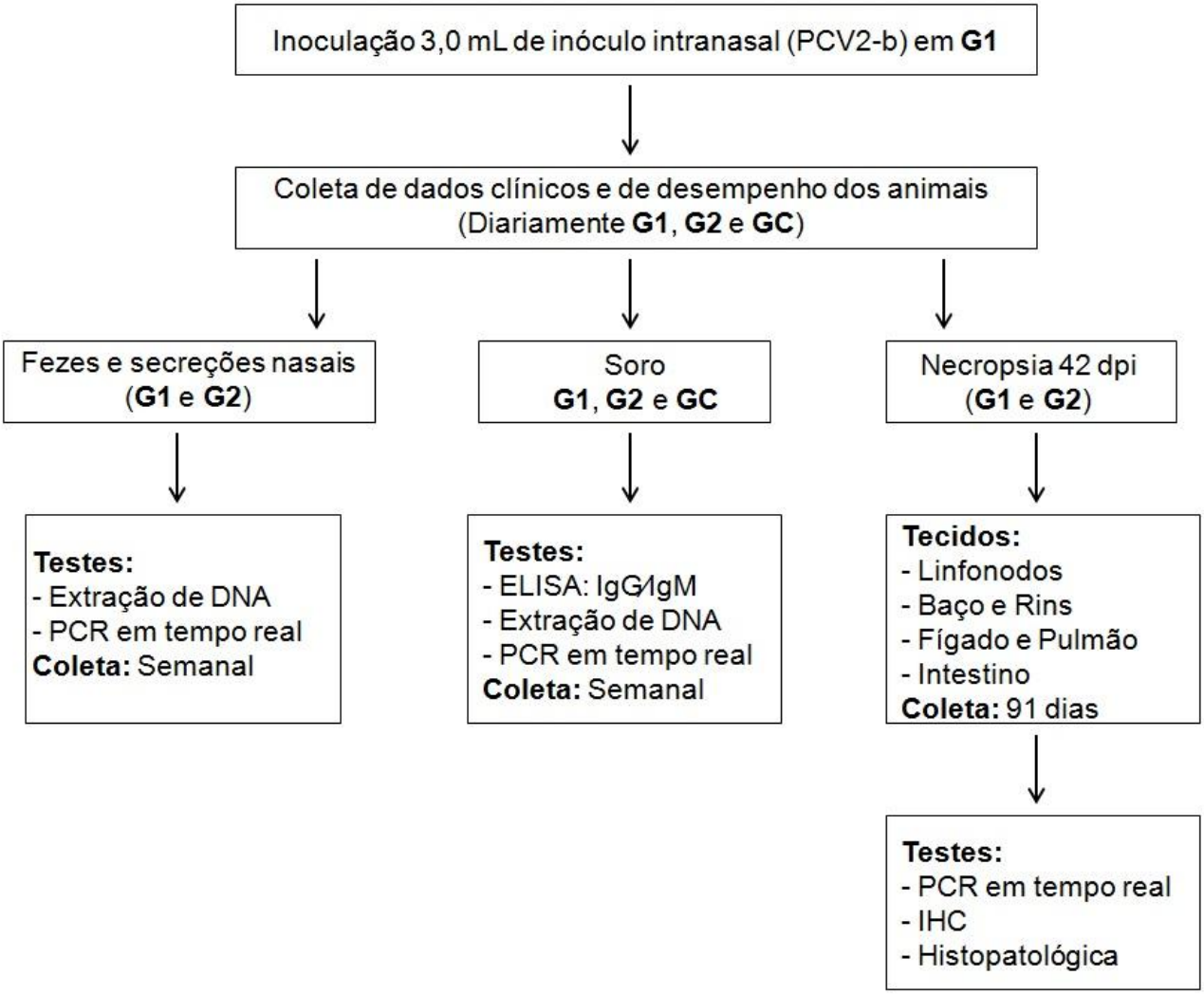
APÊNDICE A - Descrições das rações comerciais utilizadas no experimento (Quadro 1)

Quadro 1 - Descrição das rações comerciais utilizadas no experimento e suas respectivas indicações e níveis de garantia

Ração	Empresa	Indicação	Níveis de garantia
Porcomel®/Pré-inicial I	Nutron	Complementa o aleitamento na fase de maternidade e adapta o leitão na transferência para a creche	Não informado pelo fabricante.
Leitãosui® maternidade	Guabi	Leitões a partir de sete dias de vida até 25 dias de vida ou um consumo total de 1,0 kg por leitão.	Umidade (máx) 13 %; Proteína Bruta (mín.) 19 %; Extrato Etéreo (mín.) 3 %; Matéria Fibrosa (máx.) 3,5 %; Matéria Mineral (máx.) 8 %; Cálcio (máx.) 1 %; Fósforo (mín.) 0,58 %
Leitãosui® Pré I	Guabi	Leitões de 26 a 35 dias de idade.	Umidade (máx) 13 %; Proteína Bruta (mín.) 19 %; Extrato Etéreo (mín.) 3 %; Matéria Fibrosa (máx.) 3,5 %; Matéria Mineral (máx.) 8 %; Cálcio (máx.) 1,0 %; Fósforo (mín.) 0,58 %
Leitãosui® Pré II	Guabi	Leitões, de 36 a 49 dias de idade, ou opcionalmente de 7 a 49 dias de idade.	Umidade (máx) 13 %; Proteína Bruta (mín.) 18,5 %; Extrato Etéreo (mín.) 3 %; Matéria Fibrosa (máx.) 4 %; Matéria Mineral (máx.) 8 %; Cálcio (máx.) 1,0 %; Fósforo (mín.) 0,56 %

APÊNDICE B - Resumo das atividades, relacionadas ao processamento das amostras coletadas na infecção experimental (Figura 1)

Figura 1 - Esquema de coleta dos dados clínicos, amostras e os testes descritos no projeto inicial



APÊNDICE C - Condições da reação em cadeia pela polimerase para os diferentes agentes

Condição de reação para PPV; *B. bronchiseptica*; *M. hyopneumoniae* e *P. multocida*: 2,5 µL de DNA extraído foram adicionados a uma reação com volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de *DreamTaq™ Green PCR Master Mix* (2 X) (Fermentas, EUA), 10 pmol de cada *primer* (senso/antisenso), especifico de cada agente (quadro 2) e água livre de DNAse q.s.p.

Quadro 2 - Descrição dos pares de *primers* (sequências de nucleotídeos e os respectivos valores dos tamanhos dos fragmentos amplificados) das PCR utilizadas no experimento

Detecção	*Primers**	Sequência 5' - 3' (nt)	Fragmento
Parvovírus	PPVF	AAG AGC CTT TGG TGA AA	414 bp
	PPVR	AGA TTG GAG CAA AGG CA	
B. bronchiseptica	BordF	CGC ATT TCC TAC TAC ATG CG	309 bp
	BordR	GAC TAT CTG CAT AAA TAC GAA	
M. hyopneumoniae	MycoF	AAG TTC ATT GCT AGC CC	630 bp
	MycoR	GCT CCT ACT TAT TGC CC	
P. multocida	PastF	TTT GGT GGT TAT GTC TTC T	282 bp
	PastR	AGT CAC AGA TTG TGC GTA G	

Identificação pessoal dos *primers

As amplificações foram realizadas num termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research), nas condições descritas a seguir:

Quadro 3 - Condições utilizadas para amplificar os fragmentos dos diferentes agentes no experimento

Detecção	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação de DNA	Hibridação dos *Primers*	Polimerização	Extensão
Parvovírus	94 °C/ 15 min.	40	94 °C/30 seg.	55 °C/30 seg.	72 °C/30 seg.	72°C/5 min.
B. bronchiseptica	94 °C/ 10 min.	25	94 °C/30 seg.	55 °C/30 seg.	72 °C/45 seg.	72°C/7 min.
M. hyopneumoniae	94 °C/ 10 min.	39	94 °C/30 seg.	57 °C/30 seg.	72 °C/60 seg.	72°C/7 min.
P. multocida	94 °C/ 10 min.	39	94 °C/30 seg.	57 °C/30 seg.	72 °C/60 seg.	72°C/7 min.

.

APÊNDICE D - Cálculo de concentração do DNA plasmideal

Peso do plasmídeo + Peso do inserto (PCV2)

890.733,5 g + 44.222,7 g = **934.956,2 g**.

Número de cópias de DNA por µL

934.956,2 g ---------- 1 M ---------- $6,02 \times 10^{23}$ cópias de DNA

Arredondando...

$9,5 \times 10^{5}$ g ---------- $6,02 \times 10^{23}$ cópias de DNA

y ---------- 1 cópia de DNA

$y = 9,5 \times 10^{5} \div 6,02 \times 10^{23} = 1,58 \times 10^{-18}$ g

Clone quantificado por espectrofotômetro = 15,4 ng/ µL

$1,58 \times 10^{-18}$ g ---------- 1 cópia de DNA

$1,54 \times 10^{-8}$ g ---------- z

$z = 1,54 \times 10^{-8}$ g $\div 1,58 \times 10^{-18}$ g = **$9,7 \times 10^{9}$ cópias de DNA**

APÊNDICE E - Números de acesso das 140 sequências de nucleotídeos do Genbank utilizadas para alinhamento e análise das sequências obtidas no experimento (Quadro 4)

Quadro 4 - Número de acesso das sequências nucleotídicas disponíveis no Genbank utilizadas para alinhamento e análise das sequências obtidas no trabalho

AB072302	AF109398	AF117753	AY556474	AF154679	AF166528	AF364094
AY146993	AY180396	AY180397	AY256455	AY256459	AF201308	AF201309
AF201310	AF201307	AF109399	AF201305	AF201306	AF264043	AF264043
AF381176	AY256456	AY256458	AY288135	AY424402	AY424403	AB072301
EF067853	AF085695	AF086834	AF086835	AF086836	AF112862	AF118095
AF118097	AY682994	AY181946	AY035820	DQ104423	DQ104421	DQ104419
AY325495	AY181948	AY094619	AF544024	AF520783	AF465211	AF454546
AF408635	AF381177	AF381175	AF264042	AF264041	AF264040	AF264039
AF264038	AY682995	AY682996	AY713470	AY864814	AY943819	DQ151643
AF201897	AJ293869	AJ177626	AY181945	AY188355	AY217743	AY256457
AY256460	AY321987	AY321986	AY321985	AY321984	AY321983	AY321982
AY322002	AY321994	AY321991	AY322003	AY391729	AY424404	AY424405
AY321990	AY321989	AY291316	AY682992	AY678532	AY641542	AY596823
AY321988	AY291318	AY682993	AY682990	AY651850	AY613854	AY604430
AY484407	AY484408	AY484409	AY484411	AY484412	AY484413	AY484414
AY484415	AY484416	AY536755	AY556475	AY556477	AY578327	AY579893
AY596822	AY682997	AY686762	AY686764	AY691169	AY691679	AY732494
AY849938	AY916791	AY969004	DQ017036	DQ104422	DQ141322	DQ629120
DQ629121	DQ629122	DQ629123	DQ629124	DQ629127	DQ629128	DQ629129
DQ629130	DQ629131	DQ629132	DQ629133	DQ629134	DQ629135	EF028202

APÊNDICE F - Resultados do teste sorológico através de ELISA (INGEZIM Circovírus IgG/IgM) antes e após a inoculação

Quadro 5 - Leitura da densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovírus IgG/IgM) para IgM anti-PCV2 no soro dos leitões antes e após a inoculação

Grupo	Animal	IgM 7	IgM 14	IgM 21	IgM 28	IgM 35	IgM 42	IgM 49	IgM 56	IgM 63	IgM 70	IgM 77	IgM 84	IgM 91
G1 (Inoculados)	727	0,209	0,218	0,2	0,194	0,247	0,2	0,155	0,121	0,368	0,439	0,304	0,226	0,24
	722	0,201	0,198	0,192	0,222	0,274	0,198	0,246	0,144	0,23	0,203	0,22	0,264	0,266
	729	0,211	0,185	0,197	0,205	0,274	0,185	0,158	0,151	0,252	0,264	0,234	0,234	0,232
G2 (Contactantes)	738	0,194	0,215	0,201	0,203	0,264	0,208	0,189	0,143	0,181	0,224	0,2	0,188	0,195
	721	0,196	0,231	0,183	0,216	0,258	0,194	0,144	0,135	0,208	0,162	0,192	0,263	0,224
	737	0,206	0,218	0,194	0,203	0,265	0,242	0,161	0,179	0,173	0,248	0,19	0,285	0,314
GC (Controle)	719	0,208	0,204	0,21	0,209	0,27	0,222	0,162	0,139	0,226	0,245	0,217	0,219	NR
	724	0,217	0,195	0,221	0,197	0,236	0,222	0,167	0,141	0,196	0,163	0,177	0,214	NR
	742	0,205	0,203	0,197	0,217	0,249	0,192	0,14	0,118	0,216	0,228	0,195	0,217	NR
								0 dpi	**7 dpi**	**14 dpi**	**21 dpi**	**28 dpi**	**35 dpi**	**42 dpi**

Quadro 6 - Leitura da densidade óptica do ELISA (INGEZIM Circovírus IgG/IgM) para IgG anti-PCV2 no soro dos leitões antes e após a inoculação

Grupo	Animal	IgG 7	IgG 14	IgG 21	IgG 28	IgG 35	IgG 42	IgG 49	IgG 56	IgG 63	IgG 70	IgG 77	IgG 84	IgG 91
G1 (Inoculados)	727	0,636	0,7	0,563	0,464	0,425	0,333	0,212	0,155	0,194	0,238	0,397	0,356	0,31
	722	0,836	0,819	0,643	0,555	0,494	0,44	0,33	0,232	0,307	0,202	0,383	**0,612**	**0,651**
	729	0,673	0,642	0,537	0,475	0,457	0,411	0,278	0,227	0,202	0,26	0,373	0,312	**0,409**
G2 (Contactantes)	738	0,763	0,911	0,463	0,406	0,408	0,455	0,29	0,182	0,182	0,241	0,155	0,132	0,158
	721	0,851	0,942	0,388	0,337	0,378	0,293	0,201	0,16	0,291	0,196	0,158	0,143	0,141
	737	0,777	0,844	0,534	0,44	0,478	0,445	0,299	0,222	0,242	0,284	0,201	0,156	0,12
GC (Controle)	719	0,685	0,687	0,511	0,411	0,379	0,33	0,235	0,21	0,209	0,258	0,216	0,167	NR
	724	0,697	0,683	0,749	0,547	0,576	0,485	0,323	0,236	0,322	0,208	0,192	0,158	NR
	742	0,679	0,612	0,478	0,429	0,376	0,286	0,146	0,153	0,144	0,218	0,152	0,125	NR
								0 dpi	**7 dpi**	**14 dpi**	**21 dpi**	**28 dpi**	**35 dpi**	**42 dpi**

NR = Não realizado

APÊNDICE G - PCRq das amostras de soros dos animais experimentalmente infectados (G1) e contactantes (G2)

Quadro 7 – Amostras de soro dos animais do G1 e G2 com os respectivos valores da quantificação por espectrofotômetro (ng / µL) e a carga viral de PCV2 (cópias de DNA / mL) encontrada

Grupo	Animal	Dpi	Espectrofotômetro		PCRq				PCV2
			ng / µL	260/280	*Ct*	*Tm* amostra	*Tm* curva padrão*	Cópias de DNA / mL	
G1	722	0	11,1	1,24	31,26	77,96	78,11 / 78,26	4,29E+05	Negativo
		7	2,3	2,7	33,53	78,11	78,11 / 78,26	9,41E+04	Negativo
		14	7,3	1,28	34,74	77,96	78,11 / 78,26	4,21E+04	Negativo
		21	15,9	1,91	27,91	78,12	78,12 / 78,27	3,59E+06	Positivo
		28	10,3	1,18	25,70	77,82	78,12 / 78,27	1,59E+06	Negativo
		35	6	1,29	28,05	77,82	78,12 / 78,27	3,27E+06	Negativo
		42	5,3	1,05	30,28	77,67	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,42	6,96E+05	Negativo
	727	0	12,1	1,8	33,36	77,96	78,11 / 78,26	1,06E+05	Negativo
		7	0,6	0,38	31,43	77,96	78,11 / 78,26	3,84E+05	Negativo
		14	29,9	1,4	32,91	77,81	78,11 / 78,26	1,43E+05	Negativo
		21	4,3	1,35	31,96	77,82	78,12 / 78,27	2,36E+05	Negativo
		28	12	2,05	30,03	77,97	78,12 / 78,27	8,66E+05	Negativo
		35	19,6	1,69	30,00	77,82	78,12 / 78,27	8,82E+05	Negativo
		42	4,3	1,06	28,31	77,67	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,42	2,63E+06	Positivo
	729	0	9,4	1,56	32,77	78,11	78,11 / 78,26	1,57E+05	Negativo
		7	2,9	1,23	32,67	77,96	78,11 / 78,26	1,67E+05	Negativo
		14	11	1,14	31,94	77,96	78,11 / 78,26	2,72E+05	Negativo
		21	1,9	1,83	34,01	77,97	78,12 / 78,27	5,98E+04	Negativo
		28	16,7	1,47	32,31	77,97	77,97 / 78,12	2,97E+04	Negativo
		35	7	1,55	29,14	77,97	77,97 / 78,12	2,61E+05	Positivo
		42	2,5	1,46	27,25	77,82	77,97 / 78,12	9,51E+05	Positivo
G2	721	0	21,5	2,3	30,85	78,11	78,11 / 78,26	5,64E+05	Negativo
		7	6,6	1,52	34,11	78,11	78,11 / 78,26	6,42E+04	Negativo
		14	2,09	1,03	37,48	74,83	78,11 / 78,26	6,77E+03	Negativo
		21	1,9	1,29	36,52	78,57	78,12 / 78,27	1,11E+04	Negativo
		28	7,5	1,1	30,39	77,97	78,12 / 78,27	6,81E+05	Negativo
		35	25,9	1,49	30,98	78,12	78,12 / 78,27	4,58E+05	Negativo
		42	4,7	1,1	30,58	74,98	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,41	5,67E+05	Negativo
	737	0	6,3	1,73	32,43	77,96	78,11 / 78,26	1,97E+05	Negativo
		7	1,1	3,6	34,43	78,26	78,11 / 78,26	5,18E+04	Negativo
		14	8,1	1,18	35,20	78,11	78,11 / 78,26	3,09E+04	Negativo
		21	4,7	1	35,14	74,24	78,12 / 78,27	2,81E+04	Negativo
		28	3,8	1,4	33,24	74,09	77,97 / 78,12	1,57E+04	Negativo
		35	56,8	1,57	32,28	77,82	77,97 / 78,12	3,03E+04	Negativo
		42	6,4	1,18	30,15	77,82	77,97 / 78,12	1,31E+05	Negativo
	738	0	52,1	1,51	33,94	77,81	78,11 / 78,26	7,19E+04	Negativo
		7	22,9	1,93	33,85	78,26	78,11 / 78,26	7,61E+04	Negativo
		14	18,5	1,13	34,77	77,52	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,41	3,33E+04	Negativo
		21	3,7	1,17	36,35	77,97	78,12 / 78,27	1,24E+04	Negativo
		28	3,9	1,74	30,63	75,14	78,12 / 78,27	5,78E+05	Negativo
		35	39,7	1,56	32,17	77,52	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,41	1,94E+05	Negativo
		42	7,7	1,51	29,95	78,22	77,81 / 77,96 /78,11 / 78,42	8,69E+05	Positivo

*Os valores de *Tm* da curva padrão referem-se às respectivas corridas de cada amostra.

APÊNDICE H - PCRq dos suabes fecais dos animais experimentalmente infectados (G1) e contactantes (G2)

Quadro 8 - Amostras de suabes fecais dos animais do G1 e G2 com os respectivos valores da quantificação por espectrofotômetro (ng / µL) e a carga viral de PCV2 (cópias de DNA / suabe) encontrada

Grupo	Animal	Dpi	Espectrofotômetro		PCRq				PCV2
			ng / µL	260/280	*Ct*	*Tm* amostra	*Tm* curva padrão*	Cópias de DNA / suabe	
G1 (Inoculados)	722	0	28,2	1,67	32,22	78,12	78,12 / 78,26	1,89E+03	Negativo
		7	17,5	1,59	28,61	77,67	78,12 / 78,26	1,93E+04	Negativo
		14	64,7	1,6	27,24	77,82	78,12 / 78,26	4,66E+04	Negativo
		21	32,3	1,48	30,52	77,81	78,11 / 77,96	7,08E+03	Negativo
		28	6,9	1,65	32,32	77,81	78,11 / 77,96	2,23E+03	Negativo
		35	12,5	1,44	33,20	77,81	78,11	1,24E+03	Negativo
		42	19,9	1,51	33,57	77,96	78,11	9,79E+02	Negativo
	727	0	44,4	1,76	30,81	78,41	78,12 / 78,26	4,67E+03	Negativo
		7	34	1,71	28,00	77,82	78,12 / 78,26	2,86E+04	Negativo
		14	21,2	1,64	29,26	77,82	78,12 / 78,26	1,27E+04	Negativo
		21	100,7	1,6	28,31	77,66	78,11 / 77,96	2,90E+04	Positivo
		28	18,5	1,23	32,52	77,66	78,11 / 77,96	1,96E+03	Negativo
		35	8,8	0,87	32,94	77,81	78,11	1,47E+03	Negativo
		42	30,7	1,44	33,32	77,81	78,11	1,15E+03	Negativo
	729	0	58,8	1,81	31,50	74,24	78,12 / 78,26	3,00E+03	Negativo
		7	15,9	1,59	26,94	77,97	78,12 / 78,26	5,66E+04	Negativo
		14	48,5	1,73	30,30	77,81	78,11 / 77,96	8,12E+03	Negativo
		21	164	1,65	27,63	77,81	78,11 / 77,96	4,49E+04	Positivo
		28	12,4	1,52	34,31	77,66	78,11 / 77,96	6,23E+02	Negativo
		35	5,7	1,3	34,13	78,11	78,11	6,82E+02	Negativo
		42	15,7	1,43	32,51	72,60	78,11	4,27E+03	Negativo
G2 (Contactantes)	721	0	59,4	1,66	31,00	77,96	77,11 / 77,97 / 78,26	3,09E+04	Negativo
		7	26,9	1,64	30,63	77,81	77,11 / 77,97 / 78,26	1,95E+04	Negativo
		14	43	1,68	32,87	77,81	77,11 / 77,97 / 78,26	4,17E+03	Negativo
		21	30,2	1,67	31,46	73,94	78,11 / 77,96	3,87E+03	Negativo
		28	7,7	1,45	36,10	77,81	78,11 / 77,96	1,99E+02	Negativo
		35	4,5	1,45	32,22	77,96	78,11	2,33E+03	Negativo
		42	4,3	0,95	36,55	73,94	78,11	1,43E+02	Negativo
	737	0	51,7	1,71	34,42	77,96	77,11 / 77,97 / 78,26	1,44E+03	Negativo
		7	84,2	1,8	30,22	77,81	77,11 / 77,97 / 78,26	2,61E+04	Negativo
		14	59,6	1,88	31,70	77,96	77,11 / 77,97 / 78,26	9,39E+03	Negativo
		21	23,5	1,56	34,10	74,09	77,11 / 77,97 / 78,26	1,80E+03	Negativo
		28	15,9	1,66	37,82	72,60	78,11 / 77,96	6,60E+01	Negativo
		35	32,5	1,54	35,07	77,81	78,11	3,71E+02	Negativo
		42	8,7	1,38	33,17	77,81	78,11	1,27E+03	Negativo
	738	0	21,8	1,8	29,86	74,69	78,12 / 78,26	8,65E+03	Negativo
		7	59,1	1,55	30,68	77,82	78,12 / 78,26	5,08E+03	Negativo
		14	36,4	1,51	25,13	74,09	78,12 / 78,26	1,81E+05	Negativo
		21	28	1,42	27,27	74,68	78,11 / 77,96	5,66E+04	Negativo
		28	10,7	1,56	33,38	77,81	78,11 / 77,96	1,13E+03	Negativo
		35	7,3	1,17	32,85	77,81	78,11 / 77,96	3,46E+03	Negativo
		42	51,5	1,54	32,50	77,22	78,11 / 77,96	4,30E+03	Negativo

*Os valores de *Tm* da curva padrão referem-se às respectivas corridas de cada amostra.

APÊNDICE I - PCRq dos suabes nasais dos animais experimentalmente infectados (G1) e contactantes (G2)

Quadro 9 - Amostras de suabes nasais dos animais do G1 e G2 com os respectivos valores da quantificação por espectrofotômetro (ng / µL) e a carga viral de PCV2 (cópias de DNA / suabe) encontrada

Grupo	Animal	Dpi	Espectrofotômetro		PCRq				PCV2
			ng / µL	260/280	*Ct*	*Tm* amostra	*Tm* curva padrão*	Cópias de DNA / suabe	
G1 (Inoculados)	722	0	26,7	1,58	32,97	74,09	78,12 / 78,26	1,17E+03	Negativo
		7	9,6	1,44	23,88	77,97	78,12 / 78,26	4,07E+05	Negativo
		14	3,8	1,03	30,93	77,97	78,12 / 78,26	4,33E+03	Negativo
		21	20,5	1,36	30,68	77,66	78,11 / 77,96	6,38E+03	Negativo
		28	9,7	1,32	34,20	74,39	78,11 / 77,96	6,68E+02	Negativo
		35	10,1	1,24	35,11	77,96	78,11	3,62E+02	Negativo
		42	15,5	1,48	35,48	77,81	78,11	2,84E+02	Negativo
	727	0	7,7	1,21	30,64	77,97	78,12 / 78,26	5,22E+03	Negativo
		7	3,4	1,62	31,98	77,97	78,12 / 78,26	2,21E+03	Negativo
		14	20,3	1,41	32,58	77,97	78,12 / 78,26	1,50E+03	Negativo
		21	14,8	1,32	30,78	77,66	78,11 / 77,96	5,97E+03	Negativo
		28	7	1,27	35,71	77,96	78,11 / 77,96	2,54E+02	Negativo
		35	3,1	1	33,04	77,81	78,11	1,38E+03	Negativo
		42	7,1	1,25	31,94	77,96	78,11	2,80E+03	Negativo
	729	0	13,6	1,59	33,21	73,35	78,12 / 78,26	9,98E+02	Negativo
		7	2,6	1,1	29,15	74,39	78,12 / 78,26	1,37E+04	Negativo
		14	6,6	1,22	29,81	77,82	78,12 / 78,26	8,91E+03	Negativo
		21	34,6	1,55	29,24	77,66	78,11 / 77,96	1,60E+04	Positivo
		28	2,5	1,39	32,95	77,81	78,11 / 77,96	1,49E+03	Negativo
		35	3,6	1,14	32,76	77,67	78,11	1,65E+03	Negativo
		42	7,3	1,34	31,55	77,96	78,11	3,60E+03	Negativo
G2 (Contactantes)	721	0	8,5	1,45	31,58	78,12	78,12 / 78,26	2,86E+03	Negativo
		7	3,4	1,13	28,48	74,54	78,12 / 78,26	2,10E+04	Negativo
		14	17,8	1,45	25,29	77,97	78,12 / 78,26	1,64E+05	Negativo
		21	33	1,48	30,84	77,81	78,11 / 77,96	5,76E+03	Negativo
		28	50,8	1,52	33,83	77,96	78,11 / 77,96	8,50E+02	Negativo
		35	4,5	0,9	35,32	74,69	78,11	3,16E+02	Negativo
		42	17,7	1,43	32,48	72,60	78,11	4,35E+03	Negativo
	737	0	10,3	1,4	29,53	74,09	78,12 / 78,26	1,07E+04	Negativo
		7	4,7	1,15	28,47	77,97	78,12 / 78,26	2,11E+04	Negativo
		14	13,2	1,41	28,07	74,24	78,12 / 78,26	2,74E+04	Negativo
		21	81,5	1,57	28,91	77,81	78,11 / 77,96	1,98E+04	Positivo
		28	2,9	1,16	35,12	77,81	78,11 / 77,96	3,72E+02	Negativo
		35	5,5	1,03	35,03	77,67	78,11	3,81E+02	Negativo
		42	1,6	0,88	31,77	74,98	78,11	3,13E+03	Negativo
	738	0	10	1,43	27,42	79,01	78,12 / 78,26	4,16E+04	Negativo
		7	15,7	1,41	26,59	77,67	78,12 / 78,26	7,10E+04	Negativo
		14	13,3	1,59	28,17	77,82	78,12 / 78,26	2,56E+04	Negativo
		21	26,7	1,46	27,93	77,66	78,11 / 77,96	3,71E+04	Positivo
		28	5,3	1,37	33,41	77,81	78,11 / 77,96	1,11E+03	Negativo
		35	6,8	1,14	34,90	77,96	78,11	4,13E+02	Negativo
		42	2,9	1,2	32,12	77,67	78,11	2,49E+03	Negativo

*Os valores de *Tm* da curva padrão referem-se às respectivas corridas de cada amostra.

APÊNDICE J - PCRq dos tecidos dos animais experimentalmente infectados (G1) e contactantes (G2)

Quadro 10 - Amostras de tecidos dos animais do G1 e G2 com os respectivos valores da quantificação por espectrofotômetro (ng / µL) e a carga viral de PCV2 (cópias de DNA / 20 mg tecido) encontrada

(CONTINUA)

Grupo	Animal	Orgão	Espectrofotômetro		PCRq				PCV2
			ng / µL	260/280	*Ct*	*Tm* amostra	*Tm* curva padrão*	Cópias de DNA / 20 mg tecido	
G1 (Inoculados)	722	baço	217,6	2,06	21,13	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	6,47E+07	Positivo
		linfonodo mediastínico	549,1	2,05	24,46	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	6,97E+07	Positivo
		linfonodo mesentérico	59,7	1,96	24,05	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	9,19E+07	Positivo
		linfonodo inguinal	38,6	2,04	20,70	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	8,60E+07	Positivo
		fígado	476,3	2,1	31,93	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	4,72E+04	Negativo
		pulmão	44,5	1,95	25,05	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	4,70E+05	Positivo
		duodeno	636	2,09	28,74	77,67	77,97 / 78,11 / 78,26	3,99E+04	Positivo
		jejuno	667,2	2,13	25,48	77,67	77,97 / 78,11 / 78,26	3,53E+05	Positivo
		íleo	720,8	2,08	17,55	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	7,09E+07	Positivo
		rim	83,1	2,08	27,80	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	7,44E+04	Positivo
	727	baço	825,8	2,1	20,21	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	1,20E+07	Negativo
		linfonodo mediastínico	198	2,02	15,55	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	2,71E+09	Positivo
		linfonodo mesentérico	102,9	2,1	20,76	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	8,29E+07	Positivo
		linfonodo inguinal	315,1	2,03	21,87	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	3,93E+07	Positivo
		fígado	787,1	2,16	24,13	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	8,68E+05	Negativo
		pulmão	241,5	1,97	24,73	77,97	77,97 / 78,11 / 78,26	5,84E+05	Positivo
		duodeno	604,1	2,03	25,45	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	3,59E+05	Negativo
		jejuno	735,9	2,08	25,17	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	4,34E+05	Negativo
		íleo	630,5	2,06	16,82	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	1,16E+08	Negativo
		rim	360,2	2,11	29,50	77,82	77,97 / 78,11 / 78,26	2,39E+04	Negativo
	729	baço	718	2,11	21,62	77,67	77,96 / 78,11	1,16E+07	Positivo
		linfonodo mediastínico	625,4	2,18	20,20	78,11	78,11 / 78,26	2,38E+09	Positivo
		linfonodo mesentérico	143,2	2,05	23,81	78,11	78,11 / 78,26	1,98E+08	Positivo
		linfonodo inguinal	93,7	1,97	24,14	78,11	78,11 / 78,26	1,58E+08	Positivo
		fígado	829,9	2,14	26,84	77,81	77,96 / 78,11	3,60E+05	Negativo
		pulmão	51,2	1,99	24,77	77,96	77,96 / 78,11	1,43E+06	Positivo
		duodeno	398	2,11	31,50	77,67	77,96 / 78,11	1,63E+04	Negativo
		jejuno	552,2	2,08	24,58	77,81	77,96 / 78,11	1,62E+06	Negativo
		íleo	650,7	2,11	19,02	77,81	77,96 / 78,11	6,54E+07	Negativo
		rim	225,4	2,1	25,97	77,67	77,96 / 78,11	6,44E+05	Negativo
G2 (Contactantes)	721	baço	756,1	2,19	34,08	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	3,48E+02	Negativo
		linfonodo mediastínico	489	2,04	34,56	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	2,53E+02	Negativo

Grupo	Animal	Orgão	Espectrofotômetro		PCRq				PCV2
			ng / µL	260/280	*Ct*	*Tm* amostra	*Tm* curva padrão*	Cópias de DNA / 20 mg tecido	
		linfonodo mesentérico	475,7	1,92	28,99	74,83	77,96 / 77,81 / 78,11	3,71E+02	Negativo
		linfonodo inguinal	504,3	2,04	31,47	77,67	77,96 / 77,81 / 78,11	1,88E+03	Negativo
		fígado	758,9	2,05	33,60	77,81	77,96 / 77,81 / 78,11	4,74E+02	Negativo
		pulmão	112,8	2,02	33,25	74,39	77,96 / 77,81 / 78,11	2,82E+02	Negativo
		duodeno	709,5	2,11	36,43	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	7,53E+01	Negativo
		jejuno	357,4	2,1	34,40	77,67	77,96 / 77,81 / 78,11	2,81E+02	Negativo
		íleo	550,7	2,07	37,49	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	3,77E+01	Negativo
		rim	308	2,12	32,87	77,22	77,97 / 78,12	6,06E+02	Negativo
	737	baço	500,8	2,06	33,69	77,67	77,96 / 77,81 / 78,11	4,48E+02	Negativo
		linfonodo mediastínico	202,1	1,88	36,03	77,67	77,96 / 77,81 / 78,11	9,73E+01	Negativo
		linfonodo mesentérico	203,6	2,04	36,08	77,81	77,96 / 77,81 / 78,11	9,46E+01	Negativo
		linfonodo inguinal	254,5	1,98	34,35	78,11	78,11 / 78,26	2,37E+03	Negativo
		fígado	722,9	2,03	34,46	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	2,70E+02	Negativo
		pulmão	130,5	1,88	35,77	77,81	77,96 / 77,81 / 78,11	1,16E+02	Negativo
		duodeno	737,3	2,09	34,84	77,67	77,96 / 77,81 / 78,11	3,20E+02	Negativo
		jejuno	1030,6	2,09	35,49	77,96	77,96 / 77,81 / 78,11	2,65E+02	Negativo
		íleo	591,7	2,08	33,36	77,67	77,97 / 78,12	1,20E+04	Negativo
		rim	318,7	2,11	30,4	77,52	77,96 / 77,81 / 78,11	9,91E+01	Negativo
	738	baço	236,7	2,04	22,66	78,12	78,12 / 78,27	5,00E+06	Positivo
		linfonodo mediastínico	486,4	1,99	19,94	78,11	78,11 / 78,26	2,86E+09	Positivo
		linfonodo mesentérico	333,3	2,04	18,34	77,97	78,12 / 78,27	9,88E+07	Negativo
		linfonodo inguinal	47,8	1,78	25,26	78,12	78,12 / 78,27	8,28E+05	Positivo
		fígado	518,6	2,06	25,02	77,97	78,12 / 78,27	9,81E+05	Negativo
		pulmão	54,5	2,07	22,98	78,12	78,12 / 78,27	4,02E+06	Positivo
		duodeno	578,4	2,07	29,25	77,83	78,12 / 78,27	5,26E+04	Negativo
		jejuno	740,8	2,08	28,05	77,83	78,12 / 78,27	1,21E+05	Negativo
		íleo	666,3	2,03	21,86	78,11	78,11 / 78,26	7,58E+08	Positivo
		rim	284,6	2,14	27,41	77,83	78,12 / 78,27	1,87E+05	Negativo

*Os valores de *Tm* da curva padrão referem-se às respectivas corridas de cada amostra.

(CONCLUSÃO)

APÊNDICE K – Resultados obtidos com os soros dos animais do experimento através das técnicas de ELISA de captura e PCRq

Quadro 11 - Resumo dos resultados sorológicos e das PCRq realizados nos soros dos animais do G1 e G2

(CONTINUA)

Grupo	Animal	Dpi	Elisa		Cópias de DNA / mL
			IgG	IgM	
G1 (Inoculados)	722	0	0,33	0,246	Negativo
		7	0,232	0,144	Negativo
		14	0,307	0,23	Negativo
		21	0,202	0,203	3,59E+06
		28	0,383	0,22	Negativo
		35	**0,612**	0,264	Negativo
		42	**0,651**	0,266	Negativo
	727	0	0,212	0,155	Negativo
		7	0,155	0,121	Negativo
		14	0,194	0,368	Negativo
		21	0,238	0,439	Negativo
		28	0,397	0,304	Negativo
		35	0,356	0,226	Negativo
		42	0,31	0,24	2,63E+06
	729	0	0,278	0,158	Negativo
		7	0,227	0,151	Negativo
		14	0,202	0,252	Negativo
		21	0,26	0,264	Negativo
		28	0,373	0,234	Negativo
		35	0,312	0,234	2,61E+05
		42	**0,409**	0,232	9,51E+05
G2 (Contactantes)	721	0	0,201	0,144	Negativo
		7	0,16	0,135	Negativo
		14	0,291	0,208	Negativo
		21	0,196	0,162	Negativo
		28	0,158	0,192	Negativo
		35	0,143	0,263	Negativo
		42	0,141	0,224	Negativo
	737	0	0,299	0,161	Negativo
		7	0,222	0,179	Negativo
		14	0,242	0,173	Negativo
		21	0,284	0,248	Negativo
		28	0,201	0,19	Negativo
		35	0,156	0,285	Negativo
		42	0,12	0,314	Negativo
	738	0	0,29	0,189	Negativo
		7	0,185	0,143	Negativo
		14	0,182	0,181	Negativo
		21	0,241	0,224	Negativo

		28	0,155	0,2	Negativo
		35	0,132	0,188	Negativo
		42	0,158	0,195	8,69E+05

(CONCLUSÃO)

APÊNDICE L – Resultados obtidos com os tecidos dos animais do experimento através das técnicas de PCRq, HE e IHC

Quadro 12 - Resumo dos resultados das PCRq e dos testes histopatológicos realizados nos tecidos dos animais do G1 e G2

(CONTINUA)

Grupo	Animal	Órgão	Cópias de DNA / 20 mg tecido	HE	IHC
G1 (Inoculados)	722	baço	6,47E+07	SA	SM
		linfonodo mediastínico	6,97E+07	SA	SM
		linfonodo mesentérico	9,19E+07	SA	SM
		linfonodo inguinal	8,60E+07	SA	SM
		fígado	Negativo	SA	NR
		pulmão	4,70E+05	PIMD	NR
		duodeno	3,99E+04	NR	NR
		jejuno	3,53E+05	NR	NR
		íleo	7,09E+07	NR	NR
		rim	7,44E+04	NR	NR
	727	baço	Negativo	SA	SM
		linfonodo mediastínico	2,71E+09	SA	SM
		linfonodo mesentérico	8,29E+07	SA	SM
		linfonodo inguinal	3,93E+07	SA	SM
		fígado	Negativo	SA	NR
		pulmão	5,84E+05	NR	NR
		duodeno	Negativo	NR	NR
		jejuno	Negativo	NR	NR
		íleo	Negativo	NR	NR
		rim	Negativo	NR	NR
	729	baço	Negativo	SA	SM
		linfonodo mediastínico	2,38E+09	SA	SM
		linfonodo mesentérico	1,98E+08	SA	SM
		linfonodo inguinal	1,58E+08	SA	SM
		fígado	Negativo	IPL	NR
		pulmão	1,43E+06	PIMD	NR
		duodeno	Negativo	NR	NR
		jejuno	Negativo	NR	NR
		íleo	Negativo	NR	NR
		rim	Negativo	NR	NR
G2 (Contactantes)	721	baço	Negativo	SA	SM
		linfonodo mediastínico	Negativo	SA	SM
		linfonodo mesentérico	Negativo	SA	SM
		linfonodo inguinal	Negativo	SA	SM
		fígado	Negativo	SA	NR
		pulmão	Negativo	PIL	NR
		duodeno	Negativo	NR	NR
		jejuno	Negativo	NR	NR
		íleo	Negativo	NR	NR
		rim	Negativo	NR	NR

Grupo	Animal	Órgão	Cópias de DNA / 20 mg tecido	HE	IHC
	737	baço	Negativo	SA	SM
		linfonodo mediastínico	Negativo	SA	SM
		linfonodo mesentérico	Negativo	SA	SM
		linfonodo inguinal	Negativo	SA	SM
		fígado	Negativo	SA	NR
		pulmão	Negativo	HM	NR
		duodeno	Negativo	NR	NR
		jejuno	Negativo	NR	NR
		íleo	Negativo	NR	NR
		rim	Negativo	NR	NR
	738	baço	5,00E+06	SA	SM
		linfonodo mediastínico	2,86E+09	SA	SM
		linfonodo mesentérico	Negativo	SA	SM
		linfonodo inguinal	8,28E+05	SA	SM
		fígado	Negativo	SA	NR
		pulmão	4,02E+06	PIM	NR
		duodeno	Negativo	NR	NR
		jejuno	Negativo	NR	NR
		íleo	7,58E+08	NR	NR
		rim	Negativo	NR	NR

*SA – Sem alteração; SM – Sem marcação; PIL - Pneumonia intersticial leve; PIM - Pneumonia intersticial moderada difusa; HM - Hiperplasia moderada de tecido linfóide associado aos brônquios; IPL - Infiltrado perivascular linfocítico focal moderado; e NR - não foram realizadas as imuno-histoquímicas.

(CONCLUSÃO)

Apêndice M - Matriz de identidade entre as sequências do inóculo (Isolado_9) e a dos tecidos dos suínos infectados por PCV2 no experimento

Matriz de identidade									
Seq->	**Inóculo**	**22MS**	**27B**	**27IN**	**27MD**	**29I**	**29MD**	**38B**	**38MD**
Inóculo	ID	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
22MS	0,997	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
27B	0,997	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
27IN	0,997	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
27MD	0,997	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000
29I	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000
29MD	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000
38B	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000
38MD	0,997	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID

Apêndice N

Figura 2 - Região de alinhamento entre as sequências de nucleotídeos de 50 sequências do Genbank, as amostras dos suínos do experimento, o inóculo utilizado (Isolado_9) e sua passagem anterior (Isolado_8) onde houve a mutação (em destaque). Os pontos indicam resíduos idênticos

```
                 810       820       830       840       850       860       870       880       890
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AB072302.1       TCATTTAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCCTGGTCGTATTTACTGTTTT
AF109398.1       ..................................................................................A.........
AF117753         ..................................................................................A.........
AY556474         ..................................................................................
AF154679         ...................................................A..............................T.............
AF166528         ...................................................A..
AF364094         ...................................................A.....G..........................
AY146993         .......T...........................................A..
AY180396         ...................................................A..
AY180397         ................................G..................A..
AY256455         .A................................................
AY256459         ..................................................................................A.........
AF381176         ..................................................................................A.........
AY256456         ..
AY256458         ..
AY424402         ..
DQ104419         ..........G.......................................
DQ104421         ..........G.......................................
DQ104423         ..........G.......................................
DQ151643         ....................................C.....................T.....................................
AF201897         .....A.......................................................T............A.........
AJ293869         .....A.......................................................T............A.........
AY177626         .....A.......................................................T............A.........
AY181945         .....A.......................................................T............A.........
AY188355         .....A.......................................................T............A.........
AY217743         .....A.......................................................T............A.........
AY256457         .....A.......................................................T............A.........
AY256460         .....A.......................................................T............A.........
AY291316         .....A.......................................................T............A.........
AY291318         .....A.......................................................T............A.........
AY321982         .....A.......................................................T
AY321986         .....A.......................................................T............A.........
AY321987         .....A.......................................................T............A.........
AY321988         .....A.......................................................T............A.........
AY321989         .....A.......................................................T............A.........
AY691169         .....A.......................................................T............A.........
AY691679         .....A.......................................................C...T........A.........
AY732494         .....A.......................................................T............A.........
AY849938         .....A.......................................................T............A.........
AY916791         .....AT......................................................T............A.........
AY969004         .....A.......................................................T............A.........
DQ017036         .....A.......................................................T............A.........
DQ104422         .....A.......................................................T............A.........
DQ141322         .....A.......................................................T............A.........
AY424403         ..
AB072301         ..
AF085695         ..
AF086834         ..
AF086835         ..
Isolado_8        .....A.......................................C.......T............A.........
Isolado_9        .....A.......................................C.......T............A.........
22MS             .....A.......................................C.......T..........T.A.........
27IN             .....A.......................................C.......T..........T.A.........
27MD             .....A.......................................C.......T..........T.A.........
29MD             .....A.......................................C.......T..........T.A.........
38B              .....A.......................................C.......T..........T.A.........
38MD             .....A.......................................C.......T..........T.A.........
```

Apêndice O

Figura 3 - Região de alinhamento entre as sequências de nucleotídeos de 50 sequências do Genbank, as amostras dos suínos do experimento, o inóculo utilizado (Isolado_9) e sua passagem anterior (Isolado_8) onde houve a mutação (em destaque). Os pontos indicam resíduos idênticos

```
                1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
AB072302.1      TTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGTATAGAGATTTTGTTGGTCCCCCCTCCTGGGGGAACAAAGTCGTCAATTTTAAATCTCAGCATGTC
AF109398.1      ..................................................................................................
AF117753        ..........................................................C.................T.........
AY556474        ...................................C......................C.......G............A.......
AF154679        ..........................................................C................T...A.C.....
AF166528        ..........................................................C................T...A.......
AF364094        ..........................................................C................T...A.......
AY146993        ..C.......................................................G................T...A.......
AY180396        ..........................................................C................T...A.......
AY180397        ..........................................................C................T...A.......
AY256455        ..........................................................C...........................
AY256459        ..................A.......................................C...........................
AF381176        ..........................................................C...................GA.......
AY256456        ..........................................................C...................GA.......
AY256458        ..........................................................C...................GA.......
AY424402        ..........................................................C...................GA.......
DQ104419        ..........................................................C...................G........
DQ104421        ..........................................................C...................G........
DQ104423        ..........................................................C...................G........
DQ151643        ........C......................C.C..T..GGGG...T.AG................G......A.T...A.......
AF201897        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AJ293869        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY177626        ..............C................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY181945        ................C..............C.C....CGGGG...T.AG................G......A.TG..A..G....
AY188355        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY217743        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY256457        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY256460        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY291316        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY291318        ...............................C.C..G.CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY321982        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY321986        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY321987        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY321988        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY321989        ................C..............C.C....CGGGG...T.AG................G......A.TG..A..G....
AY691169        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY691679        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY732494        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY849938        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY916791        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY969004        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
DQ017036        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
DQ104422        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....G.
DQ141322        ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....
AY424403        ..........................................................C...................GA.......
AB072301        ...................................C......................C....................AG......
AF085695        ..........................................................C...........................
AF086834        ..........................................................C....................A.......
AF086835        ..........................................................C....................A.......
Isolado_8       ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.T...A..G....T
Isolado_9       ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
22MS            ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
27IN            ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
27MD            ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
29MD            ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
38B             ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
38MD            ...............................C.C....CGGGG...T.AG................G......A.....A..G....T
```