ALESSANDRA MARNIE MARTINS GOMES DE CASTRO

Caracterização genética de amostras brasileiras
de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2)

SÃO PAULO
2005

ALESSANDRA MARNIE MARTINS GOMES DE CASTRO

Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

**SÃO PAULO
2005**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1474
FMVZ

Castro, Alessandra Marnie Martins Gomes de
Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus
suíno tipo 2 (PCV-2) / Alessandra Marnie Martins Gomes de
Castro. – São Paulo : A. M. M. G. Castro, 2005.
120 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e
Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada
às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Circovírus suíno. 2. Brasil. 3. PCV-2. 4. Caracterização
genética. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
59	2	Quadro 2	476	504
59	2	Quadro 2	338	361
59	2	Quadro 2	467	383
80	3	1	11	19
85	2	5	três	nove
85	2	5	quatro	seis

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção e caracterização genética-molecular de amostras brasileiras de Circovirus porcino (PCV)", protocolo nº511/2004, utilizando amostras de tecido de 200 suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Detection and molecular characterization of Brazilian samples of Porcine circovirus (PCV)", protocol number 511/2004, utilizing 200 porcine (samples skin) , under the responsibility of Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 09 de novembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CASTRO, Alessandra Marnie Martins Gomes

Título: Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

DATA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

VINÍCIUS DE CASTRO LORDELO

*Apenas nesta manhã, vou deixar as preocupações de lado, pegar você e levá-lo ao
parque para brincar.*

*Apenas nesta manhã, vou deixar os afazeres da casa e deixar você me ensinar a
descobrir o seu mundinho.*

*Apenas nesta tarde, vou desligar o telefone, o computador e sentar-me com você
no quintal e soltar bolhas de sabão.*

Apenas nesta tarde, não vou me preocupar com o que você vai ser quando crescer.

*Apenas nesta noite vou me aconchegar ao seu lado por horas e deixar de lado
minha leitura e programas da TV favoritos.*

*Apenas nesta noite, enquanto eu passar meus dedos entre seus cabelos, vou
simplesmente ser grato a Deus por ter me dado o maior presente do mundo.*

*E, quando eu te dar um beijo de boa noite, vou te segurar um pouquinho mais
forte por um pouquinho mais de tempo... e então agradecer a Deus por você e não
pedir nada a Ele, exceto....*

Mais um dia...

AGRADECIMENTOS

“Deus, agradeço por ter iluminado meus passos e colocado pessoas maravilhosas nessa minha eterna jornada – A VIDA”.

Aos meus pais, **Fernando e Terezinha**, agradeço o grande exemplo, dignidade, conduta profissional e por terem incentivado com amor, carinho e confiança a minha jornada profissional.

Ao meu marido, **Alfredo**, agradeço sua paciência, respeito e incentivo para mais uma conquista profissional.

Às minhas irmãs, **Maria Ângela, Maria José, Tatiana e Fabiana**, agradeço a grande e eterna amizade e apoio em todos os momentos.

Agradeço a **TODOS** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e de maneira especial:

Ao prezado orientador **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, confiança, paciência e orientação.

À Pesquisadora **Dra. Anette Mankertz** do Instituto Robert Koch P24 (Xenotransplante) de Berlim, Alemanha, por enviar amostras padrão permitindo, assim, iniciar a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, que disponibilizou seu laboratório e conhecimento, permitindo a realização da fase inicial deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo que disponibilizou seu laboratório e conhecimento durante a fase inicial deste trabalho.

Aos senhores **Koki Mogami** e **Minoru Matsunaga** (*In memorian*) e toda a sua equipe, que me apoiaram e ajudaram muito para a realização deste trabalho e principalmente pela amizade e convivência.

Ao técnico agrícola **Ranieri Moraes** e **sua família**, Meire e Lucas, que me acolheram em sua casa e principalmente pelo apoio técnico e grande amizade.

À doutoranda e **amiga Adriana Cortez**, por grande parte do conhecimento teórico e prático adquirido durante esse período e principalmente pela paciência, conselhos e companheirismo.

Ao Prof. **Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto**, do Departamento de Ciências Animais da Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM, pelo apoio, incentivo e direcionamento no início deste trabalho.

A profa. **Dra. Andréa Micke Moreno**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e sua equipe pelo envio da maior parte das amostras utilizadas no trabalho e pela grande amizade.

À pesquisadora **PqC V Josete Bersano**, do Laboratório de Suínos do Instituto Biológico, Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio-APTA da Secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, e sua equipe pela amizade, força e envio de parte das amostras utilizadas no trabalho.

Aos pesquisadores, **PqC IV José Carlos de Moura Camargo** e **PqC V Fernando Gomes de Castro Júnior**, do Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio-APTA da Secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pelo incentivo, amizade e envio de parte das amostras utilizadas no trabalho.

Ao Prof. **Dr. Rodrigo Martins Soares**, professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelas importantes sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Dr. **Marcos Bryan Heinemann**, pela análise genealógica das amostras, e principalmente pelas sugestões e grande amizade.

À doutoranda e **eterna amiga Ádina Cléia Botazzo Delbem**, pela infinita amizade, carinho, conselhos e apoio em todos os momentos.

Aos colegas pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada, **Henrique, Lara, Letticie, Nancy, Nicole e Renata** pela convivência amistosa e companheirismo.

Ao técnico **Marcelo Henrique Zeviani**, pelo apoio técnico na fase final do trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela convivência agradável.

À secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal pela convivência agradável e apoio durante esse período

À equipe da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial a **Claudia e Elza**, pela atenção e gentileza na formatação final da tese.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** pela bolsa concedida e o apoio financeiro para a realização deste trabalho (processo n. 00/12762-2).

*“A única forma de a gente saber e realmente entender algo é experimentá-lo
absolutamente por si mesmo, pois a experiência cria sabedoria”.*

William Buhlman

RESUMO

CASTRO, A. M. M. G. **Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2).** [Genetic characterization of Brazilian Porcine circovirus type 2 (PCV-2) samples]. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) pertence ao gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*. É considerado “vírus emergente”, tendo sido associado, principalmente, à Síndrome de Refugagem Multissistêmica dos suínos (SRM). O genoma circular é composto por: (i) ORF-1 que codifica a proteína replicativa; (ii) ORF-2 que codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo, (iii) região não codificadora que intercala as ORF-1 e 2 e contém a origem da replicação, denominada IGS-1 e (iv) região que intercala as ORF-1 e 2, denominada IGS-2. Oito amostras, denominadas amostras completas, tiveram mais de 1705 nucleotídeos seqüenciados (945 da ORF-1, 699 da ORF-2, 20 da IGS-1 e 39 da IGS-2); duas amostras tiveram em média 1692 nucleotídeos seqüenciados (945 da ORF-1 e 699 da ORF-2, os restantes correspondem às regiões IGS-1 e 2); uma amostra teve 1392 nucleotídeos seqüenciados (945 da ORF-1, 414 da ORF-2, 9 da IGS-1 e 24 da IGS-2) e nove amostras tiveram em média 970 nucleotídeos seqüenciados (196 da ORF-1 e 699 da ORF-2, os restantes correspondem às regiões IGS-1 e 2). Portanto, a partir dessas 20 amostras em estudo, foram obtidas: (i) oito amostras completas; (ii) 11 seqüências completas de ORF-1 e (iii) 19 seqüências completas de ORF-2, as quais foram analisadas. A identidade de nucleotídeo variou de: (i) 99,7% a 100% entre as oito amostras completas; (ii) 99,3% a 100% entre as 11 seqüências completas de ORF-1 e (iii) 91,9% a 100% entre as 19 seqüências completas de ORF-2. A topologia das árvores genealógicas utilizando as oito seqüências completas e as 11 seqüências completas de ORF-1 foi similar, agrupando todas as amostras em estudo em um só

grupo denominado subtipo PCV-2a. Pela análise da genealogia da ORF-1 observou-se que todas as amostras agruparam-se com uma amostra de PCV-2 associada à Síndrome de Dermatite e Nefropatia suína (PDNS), formando um grupo separado das amostras de PCV-2 associadas à Síndrome de Refugagem Multissistêmicas dos suínos (SRM) e abortamento. A genealogia proposta para as 19 amostras que tiveram a ORF-2 sequenciada, dividiu as amostras em dois grupos, sendo que 14 amostras agruparam-se num grupo denominado subtipo PCV-2a e 5 no subtipo PCV-2b. Os resultados mostraram a circulação de, pelo menos, dois subtipos de PCV-2 no Brasil.

Palavras-chave: Circovírus suíno. Brasil. PCV-2. Caracterização genética.

ABSTRACT

ABSTRACT

CASTRO, A. M. M. G. **Genetic characterization of Brazilian Porcine circovirus type 2 (PCV-2) samples.** [Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2)]. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Porcine circovirus 2 belongs to *Circovirus* genus and *Circoviridae* family. It is considered an “emerging virus” being associated to Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). The circular viral genome is formed by: (i) ORF-1 coding for the replicative associated proteins; (ii) ORF-2 encoding the structural proteins of the viral capsid; (iii) a non-coding intergenic sequence between ORF-1 and ORF-2 containing the replicative origin of the viral genome (IGS-1) and (iv) a second non-coding intergenic sequence between ORF-1 and ORF-2 (IGS-2). Eight samples, named complete sequences, had about 1705 nucleotides determined (945 from ORF-1, 699 from ORF-2, 20 from IGS-1 and 39 from IGS-2); two samples had about 1692 nucleotides sequenced (945 from ORF-1, 699 from ORF-2, and the rest from IGS-1 and 2); one sample had 1392 nucleotides sequenced (945 from ORF-1, 414 from ORF-2, 9 from IGS-1 and 24 from IGS-2) and nine samples had about 970 nucleotides sequenced (196 from ORF-1, 699 from ORF-2, and the rest from IGS-1 and 2). Therefore, from the 20 samples it was obtained: (i) eight complete sequences; (ii) 11 complete sequences of ORF-1 and (iii) 19 complete sequences of ORF-2. The identity at nucleotide level was from: (i) 99,7% to 100% among the eight complete sequences; (ii) 99,3% to 100% among the 11 sequences of ORF-1 and (iii) 91,9 to 100% among the 19 sequences of ORF-2. The topology of the tree generated by the ORF-1 analysis revealed a cluster formed by the Brazilian samples of PCV-2 and the samples associated to PDNS and another cluster formed by the PCV-2 associated to other syndromes. The genealogy presented for the 19 samples

using the data from ORF-2 revealed the presence of two clusters, one of them formed by 14 samples named subtype PCV-2a and the other formed by 5 samples, named PCV-2b. The results demonstrated that, at least, two subtypes of PCV-2 circulate in Brazil.

Key words: Porcine circovirus. Brazil. PCV-2. Genetic characterization.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mapa linear de PCV-2. A região intergênica compreende a origem de replicação (octanucleotídeo) com a sequência palindrômica arranjada em alça (*stem-loop*). Na região 5' e 3', grifados em cinza, estão os códons de iniciação da *CR* (5') e *Rep* (3') (CHEUNG, 2004 adaptado) 51
- Figura 2-** Representação linear de PCV-2 com as regiões das proteínas Cap, Rep e Rep' e regiões não codificadoras, *splicing* e *poly A*. A localização dos nucleotídeos foi baseada na sequência de PCV-2 do GenBank (acesso: AY094619) (CHEUNG, 2004, adaptado)..... 51
- Figura 3-** Representação linear de PCV-2 com as ORF-1 e 2. A localização dos nucleotídeos da amostra 16 (33:1004 e 1005:1757) foi baseada na sequência de PCV-2 do GenBank (acesso: AY094619) (CHEUNG, 2004, adaptado)..... 57
- Figura 4-** Mapa linear de PCV-2 e localização esquemática dos *primers* para seqüenciamento da ORF-1 e 2 (CHEUNG, 2004, adaptado) 60
- Figura 5-** Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando as seqüências de 1705nt. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,32). Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) 73

Figura 6- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando a sequência da ORF-1 (945nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,35). Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)76

Figura 7- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de PCV-2 associado sinais clínicos, usando a sequência da ORF-1 (945nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)77

Figura 8- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando a sequência da ORF-2 (699nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas).....82

Figura 9- Alinhamento de amostras de PCV-2 de diferentes países e localização do *primer* F66. Os pontos indicam resíduos idênticos. O *primers* F66/B67 estão representados em negrito e itálico88

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** Informações quanto ao par de *primers*, localização da região seqüenciada, Estado, material empregado, idade do animal (dias) e ano de coleta das 20 amostras de suínos positivas de PCV-2 por PCR que tiveram a região ORF-1 ou ORF-2 ou ambas seqüenciadas 56
- Quadro 2-** Seqüência dos pares de *primers* F66/B67 (detecção), Fa2/Ra2 (detecção e seqüenciamento), Fb2/Rb2, Fc2/Rc2, Fd2/Rd2, Fe2/Re2 e Ff2/Rf2 (seqüenciamento) de PCV-2, localização da região de hibridação e os respectivos valores do tamanho dos fragmentos amplificados. Localização dos nucleotídeos baseado na seqüência do GenBank (n. acesso AF027217) 59
- Quadro 3-** Reação utilizada para amplificar diferentes fragmentos de PCV-2 61
- Quadro 4-** Condições utilizadas para amplificar diferentes fragmentos de PCV-2 61
- Quadro 5-** Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as oito amostras brasileiras de PCV-2 completas 70
- Quadro 6-** Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos nas regiões *Motif* 1, 2 e 3 entre as oito amostras brasileiras de PCV-2 e de diferentes países 71

Quadro 7- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-1 de PCV-2 das amostras em estudo..... 74

Quadro 8- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-2 de PCV-2 das amostras em estudo..... 80

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcento
±	mais ou menos
≥	maior ou igual
μg	micrograma
μL	microlitro
<	menor
>	maior
°C	graus Celsius
aa	aminoácido
BFDV	Vírus da doença dos bicos e penas
CaCV	Circovírus dos canários
Cap	Proteína estrutural
CAP3	<i>Contig Assembly Program</i>
CAV	Vírus da anemia das galinhas
CoCV	Circovírus dos columbídeos
CoGV	Circovírus dos gansos
CR	Transcrito imediato
CsCl	Cloreto de Césio
CT	Tremor Congênito
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático

et al.	e colaboradores
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	gramas
hab	habitante
IFI	Imunofluorescência indireta
IP	Imunoperoxidase
Kb	quilobases
kDa	quilodalton
Kg	quilo
M	molar
Mega	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MG	Minas Gerais
Mg ²⁺	magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min.	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
Mn ²⁺	manganês
m-PCR	<i>Multiplex</i> PCR
nd	Nenhum dado
ng	nanograma
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
nm	nanômetro
n-PCR	<i>nested</i> PCR
npPCV	não patogênico PCV
nt	nucleotídeos
ORF	Fase aberta de leitura
p/v	peso/volume

pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV-1	Circovírus suíno tipo 1
PCV-2	Circovírus suíno tipo 2
PDNS	Síndrome de Dermatite e Nefropatia suína -
pH	concentração de hidrogênio iônico
PiCV	Circovírus dos pombos
PK-15	células de rim de suíno - 15
pmol	picomol
PMWS	Síndrome de Refugagem Multissistêmica dos suínos
pmws PCV	PCV associado à Síndrome de Refugagem Multissistêmica dos suínos
PNP	Pneumonia Proliferativa Necrosante
PPV	Parvovírus suíno
PRDC	Complexo Respiratório suíno
PRRSV	Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva
Rep	Proteína replicativa
RFLP-PCR	Polimorfismo de fragmento de restrição do produto de PCR
RNA	ácido ribonucléico
S	Svedberg coeficiente de sedimentação
s	segundos
SC	Santa Catarina
SIV	Vírus influenza suíno
SP	São Paulo
SRM	Síndrome de Refugagem Multissistêmica dos suínos
TE	Tampão TRIS-EDTA
TRIS	hidroximetil-aminometano
U	unidades

USP	Universidade de São Paulo
V/cm	Volt/centímetro
VDA	Vírus da doença de Aujeszky
x	vezes
x g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)

OBS: Visto estarem consagradas na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
1.1	OBJETIVOS	35
2	REVISÃO DE LITERATURA	37
2.1	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	38
2.2	EPIDEMIOLOGIA	39
2.3	DOENÇAS ASSOCIADAS COM PCV-2	41
2.4	DIAGNÓSTICO	46
2.4.1	<i>Métodos diretos</i>	46
2.4.2	<i>Métodos indiretos</i>	48
2.5	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO CIRCOVÍRUS SUÍNO	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	AMOSTRAS	54
3.1.1	<i>Padrão positivo utilizado no desenvolvimento da PCR para detecção de PCV-2</i>	54
3.1.2	<i>Amostras de clínicas</i>	55
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	57
3.3	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	58
3.4	SEQÜENCIAMENTO	62
3.5	ANÁLISE FILOGENEALÓGICA	64
4	RESULTADOS	68
4.1	RESULTADO DA PCR DAS AMOSTRAS CLÍNICAS PARA PCV-2	68
4.2	DETERMINAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	69
4.3	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	70

5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES	103

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente a produção de carne suína foi de 78,8 e 93,2 milhões de toneladas em 1995 e 2001, respectivamente, apresentando um crescimento de 18,3% neste mesmo período. Os quatros maiores produtores mundiais de carne suína são: China (43,5 milhões de toneladas), Unidade Européia (17,27 milhões de toneladas), Estados Unidos (8,8 milhões de toneladas) e Brasil (2,1 milhões de toneladas). Esses quatro países representam 80% da produção mundial (ANUALPEC, 2002).

Desde 1978 a carne suína passou a ser a carne mais consumida do mundo, atingindo em 2001 um consumo mundial de 14,9 Kg/hab/ano. No Brasil o consumo médio em 2001 foi de 11,2 Kg/hab/ano (ANUALPEC, 2002).

No Brasil, a intensificação crescente do processo de criação aumentou a produção de carne suína, permitindo em 2001 a exportação de 267 mil toneladas destinadas principalmente para a Rússia, Hong Kong, Argentina e Uruguai (ANUALPEC, 2002).

Considerando o *status* industrial da suinocultura, as perdas causadas pela Síndrome de Refugagem Multissistêmica dos suínos (SRM) através de mortalidade, que pode atingir até 11% na fase de crescimento/terminação, e o retardo no crescimento de animais, prejudicam sobremaneira a lucratividade deste setor produtivo (MADEC et al., 2000).

A SRM é causada pelo Circovírus suíno (PCV), considerado um patógeno emergente. Atualmente, são descritos dois tipos virais, o Circovírus tipo 1 (PCV-1) e o 2 (PCV-2), os quais são fenotipicamente e genotipicamente distintos (LIU et al., 2000). O PCV-1, reconhecido inicialmente como contaminante persistente de cultivo celular de rim suíno

(PK-15), foi identificado em leitões com tremor congênito e em animais com distúrbios reprodutivos. No entanto, como esses sinais clínicos não foram reproduzidos através de infecções experimentais, esse agente foi considerado não patogênico (ALLAN et al., 1995).

O PCV-2 foi descrito pela primeira vez em 1991 no Canadá, sendo associado à SRM. Desde então, esse agente foi detectado tanto em animais sem sinais clínicos de enfermidade como em animais com síndrome de dermatite e nefropatia suína, distúrbios reprodutivos, síndrome do complexo respiratório suíno, pneumonia proliferativa e necrosante e tremor congênito (ALLAN; ELLIS, 2000; LAROCHELLE et al., 1999).

A ocorrência de circovírus suínos tem sido descrita em vários países da Europa, Ásia e América (ALLAN; ELLIS, 2000). No Brasil, há detecção do PCV-2 desde o início desta década mostrando desta maneira a importância de se testar rotineiramente os animais (CASTRO et al., 2004; CIACCI-ZANELLA et al., 2001). Entre os testes de diagnóstico, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo utilizada com êxito na detecção e caracterização de PCV em amostras de tecidos.

Além do impacto nas criações de suíno comercial, o Circovírus suíno tem despertado grande interesse grupos que pesquisam transplante de órgão entre espécies, o xenotransplante.

O xenotransplante é considerado uma das soluções para a falta de órgãos existentes em vários países (BONEVA; FOLKS; CHAPMAN, 2001). Dentre os animais mais pesquisados, temos os suínos, que na idade adulta atingem um tamanho que torna seus órgãos compatíveis com o do ser humano adulto. Uma das principais barreiras dessa atividade é a possibilidade de transmissão de doenças. O risco do receptor (ser humano) ser infectado por alguma zoonose pode ser reduzido a níveis desprezíveis com a seleção de animais de origem segura e utilização de métodos de diagnóstico sensíveis nos animais e/ou órgãos antes do

transplante. No entanto, agentes que em circunstâncias normais não infectariam o ser humano podem infectá-lo após o xenotransplante. Esse fenômeno é denominado xeno-zoonose (MICHAELS; SIMMONS, 1994). Apesar do baixo risco da infecção por PCV-2 para o ser humano, já foi demonstrado que este agente é capaz de infectar linhagens de células humanas em cultivo (TUCKER et al., 2003).

O pequeno genoma do PCV tem sido mapeado para um melhor entendimento da sua replicação, interação agente e hospedeiro e variabilidade genética.

Análise de seqüências gênicas completas entre amostras de PCV-2 de diferentes países demonstra uma identidade de aproximadamente 90%. A maior variabilidade está localizada no gene *cap*, que compreende a ORF-2 responsável pela codificação da proteína estrutural formadora do capsídeo (Cap). A variabilidade genética de amostras virais e a forma com que as mesmas comportam-se entre si permitem o entendimento dos aspectos evolutivos das linhagens. O uso dessas informações, em amostra virais circulantes, associadas a estudos de variabilidade fenotípica e antigênica constitui parâmetro fundamental para o preparo e emprego de futuras vacinas, uma vez que o capsídeo está relacionado ao desenvolvimento de imunidade (FENAUX et al., 2004).

Em face ao exposto acima, o presente trabalho tem como finalidade caracterizar molecularmente amostras de Circovírus suíno tipo 2 detectados no Brasil.

1.1 OBJETIVOS

- 1.1.1 Pesquisar a presença do PCV-2 em amostras clínicas de suínos provenientes de diferentes Estados brasileiros, utilizando a técnica de PCR.
- 1.1.2 Seqüenciar as ORF-1 e 2 das amostras de PCV-2 detectadas.
- 1.1.3 Propor uma genealogia para as amostras de PCV-2 detectadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Circovírus suíno (*Porcine circovirus* - PCV) foi relatado primeiramente por Tischer, Rasch e Tochtermann (1974), que através da microscopia eletrônica, descreveram um vírus morfolologicamente semelhante a um picornavírus, que causava infecções persistentes em cultivo celular de rim suíno (PK-15) sem induzir efeito citopático. Posteriormente, demonstraram que esse vírus possuía um genoma composto de DNA de fita simples e circular, razão pela qual denominaram-no de Circovírus suíno (TISCHER et al., 1982).

Levantamentos sorológicos em populações suínas nas regiões oeste e norte da Alemanha no período de 1979 a 1982 demonstraram uma soroprevalência de 85% para PCV, não tendo relevância, uma vez que o agente não foi associado a nenhum sinal clínico de enfermidade ou alteração morfológica. Infecções experimentais com PCV em suínos permitiram verificar a eliminação do agente nas fezes e na secreção nasal dos animais. No entanto, os animais não apresentaram sinal clínico de doença ou alterações morfológicas (TISCHER et al., 1986).

Diante desses resultados, estudos com o agente tornaram-se irrelevantes até que em 1991, na região sul do Canadá, descreveu-se à SRM. A síndrome acomete suínos de 5 a 12 semanas de idade e caracteriza-se por caquexia, perda de apetite, dispnéia, linfadenopatia, icterícia e, ocasionalmente, diarreia. Nos animais acometidos pela SRM verificou-se a presença de anticorpos anti-PCV (HARDING, 1996).

Estudos genéticos realizados em isolados de animais acometidos pela SRM no Canadá, Estados Unidos e França demonstraram uma identidade de 96% na sequência de

nucleotídeos entre as amostras. Porém, quando se comparou esses isolados com o PCV inicialmente encontrado como contaminante da linhagem de células PK-15, verificou-se uma identidade de menos de 80% sugerindo a existência de uma nova variante de PCV (HAMEL; LIN; NAYAR, 1998; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998).

Desde então, o PCV subdivide-se em dois tipos virais, os quais são fenotipicamente e genotipicamente distintos (LIU et al., 2000): o circovírus suíno tipo I (PCV-1), também denominado np PCV (PCV não patogênico) que é o PCV PK-15 detectado inicialmente como contaminante persistente em cultivo contínuo de células de rim suíno - PK-15 (TISCHER; RASCH; TOCHTERMANN, 1974) e o circovírus suíno tipo II (PCV-2) denominado, primeiramente, pmws-PCV devido a sua associação com a síndrome de refugagem multissistêmica dos suínos (MEEHAN et al., 1998).

2.1 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O PCV pertence à família *Circoviridae*, que se subdivide em dois gêneros: *Circovirus* e *Gyrovirus*. O gênero *Circovirus* compreende o Circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2), o Vírus da Doença dos Bicos e Penas (BFDV), circovírus dos columbídeos ou pombos (CoCV/PiCV), circovírus dos gansos (CoGV) e circovírus dos canários (CaCV) (BASSAMI et al., 1998; HAMEL; LIN; NAYAR, 1998; MANKERTZ et al., 1997; MANKERTZ et al., 2000; TODD et al., 2001). O gênero *Gyrovirus* compreende o Vírus da Anemia das Galinhas (CAV) (KATO et al., 1995).

O virion do PCV não é envelopado, apresenta simetria icosaédrica e mede de 15 a 17nm de diâmetro. O genoma constitui-se de DNA de fita simples com, aproximadamente, 1,76Kb, ambisenso e estrutura circular fechada por ligação covalente. É o menor vírus animal descrito, tanto em diâmetro quanto em tamanho de genoma, com capacidade de replicação autônoma em células de mamíferos. Sua replicação ocorre, obrigatoriamente, durante a multiplicação celular, pois o vírus depende de proteínas produzidas durante a fase S da mitose (STUDDERT, 1993).

O PCV-1 apresenta densidade de flutuação em CsCl de 1,33-1,34g/mL e coeficiente de sedimentação correspondente a 57S. As partículas virais intactas não possuem propriedade hemaglutinante, não são inativadas após exposição a pH 3, clorofórmio e temperaturas de 56°C e 70°C por 15 minutos (ALLAN; ELLIS, 2000; ALLAN et al., 1994; MANKERTZ et al., 1997). As características físicas do PCV-2 não foram determinadas até o presente momento.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A incidência de PCV-2 foi descrita em países da Europa, Ásia e América em suínos com ou sem sinais clínicos de SRM (ALLAN; ELLIS, 2000; MAGAR; MÜLLER; LAROCHELLE, 2000; SARRADELL et al., 2002; SATO et al., 2000; SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

No Brasil, o ácido nucléico de PCV-2 foi detectado pelas técnicas de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* –PCR) e PCR em suínos sadio e com sinais clínicos de SRM e tremor congênito (CT) (CASTRO et al., 2004; CIACCI-ZANELLA et al., 2001).

Em condições naturais, a soroconversão ocorre mais freqüentemente em leitões entre 3 e 4 semanas de idade e os anticorpos são detectados em suínos nas diferentes fases da criação (ALLAN; ELLIS, 2000). A viremia ocorre entre a 7^a e 16^a semana de idade, apresentando baixa prevalência em matrizes. Porém, a variação individual na detecção do DNA de PCV-2 pode ser de 5 a 21 semanas, demonstrando que alguns suínos podem desenvolver uma viremia persistente (SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

Os suínos podem manter PCV-2 na cavidade nasal sem estar em viremia ou apresentando sinais clínicos de doença. Questiona-se, no entanto, se o PCV-2 encontrado na cavidade nasal é oriundo de replicação do agente na mucosa nasal ou é resultado dos altos níveis do agente no ambiente. A detecção de PCV-2 em *swab* nasal, tonsilar, brônquico, urinário e fecal levanta a hipótese de que o agente pode ser transmitido via secreção oro-nasal, fecal e urinária (SEGALÉS; DOMINGO, 2002).

O agente foi isolado de fetos abortados no final da gestação e natimortos oriundos de granjas com histórico de distúrbio reprodutivo. Inoculações experimentais demonstraram que o vírus tem capacidade de replicar e de causar anormalidades nos fetos em diferentes fases da gestação (WEST; BYSTROM; WOJNAROWICS, 1999; LYOO; PARK; PARK, 2001).

2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS COM PCV-2

a) Síndrome de refugagem multissistêmica dos suínos

A Síndrome de refugagem multissistêmica dos suínos (SRM) (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* - PMWS) foi descrita primeiramente em Saskatchewan (Canadá) em 1991 e, desde então, relatada em vários países da Europa, Ásia e América. Seis sinais clínicos fundamentais formam a base do diagnóstico clínico preliminar e estão presentes na seguinte ordem de frequência: caquexia, dispnéia, linfadenopatia, diarreia, palidez e icterícia (HARDING; CLARK, 1998; HARDING et al., 1998). Outros sinais clínicos como tosse, pirexia, úlcera gástrica, meningite e morte súbita, também, têm sido relatados, porém são menos frequentes (WELLENBERG et al., 2000). Os sinais clínicos de SRM são restritos aos animais com idade entre 8 e 13 semanas (MADEC et al., 2000).

As alterações observadas durante a necropsia são broncopneumonia, edema ou dilatação de ceco, aumento de linfonodo, aumento e descoloração do fígado e nefrite intersticial (ROSELL et al., 1999).

Estudos experimentais, com a finalidade de reproduzir a SRM, têm demonstrado que o PCV-2 é um fator necessário, porém não suficiente no desenvolvimento da síndrome. Outros agentes têm sido estudados em co-infecções, dentre eles destacam-se o Parvovírus suíno (PPV) e o vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva (PRRSV) (ALLAN et al., 1999; CHOI; CHAE, 2000; HARMS et al., 2001; KENNEDY et al., 2000; CHOI et al., 2002; KRAKOWKA et al., 2001).

A campo, a SRM é, geralmente, observada em animais com PCV-2 associado a outros vírus (PRRSV, PPV, influenza suína e coronavírus) e/ou bactérias (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*) (BERSANO et al., 2003; KIM et al., 2001; MORENO et al., 2003; PALLARES et al., 2002). Essas co-infecções alteram e/ou intensificam os sinais clínicos da síndrome, dificultando a identificação da síndrome.

b) Síndrome de dermatite e nefropatia suína

A síndrome de dermatite e nefropatia suína (PDNS) foi descrita pela primeira vez em 1993 no Reino Unido (SMITH; THOMSON; DONE, 1993). Desde então, foi observada em países da Europa, América do Norte e do Sul, Oceania e África. Caracteriza-se pela presença de petéquias cutâneas localizadas principalmente na área perineal (HÉLIE et al., 1995; SEGALÉS et al., 1998), afetando leitões na fase de desmame e crescimento/terminação (THOMPSON et al., 2000a).

Os rins, macroscopicamente, apresentam-se aumentados, anêmicos e cobertos por petéquias. Os principais achados microscópicos incluem glomerulonefrite necrosante e fibrinosa e vasculite necrosante sistêmica (SEGALÉS et al., 1998; THIBAUT et al., 1998). Observam-se, também, lesões características de reação de hipersensibilidade tipo III, causadas pela deposição de imuno-complexos nas paredes dos capilares vasculares e glomerulares (DURAN; RAMOS-VARA; RENDER, 1997). Nos linfonodos encontram-se diminuições de linfócitos e em 50% dos casos verificam-se infiltrados inflamatórios granulomatosos com histiócitos e/ou células multinucleadas gigantes, principalmente na área folicular (ROSELL et

al., 2000; SEGALÉS et al., 1998). A pneumonia intersticial, também, é encontrada em animais acometidos pela PDNS (ROSELL et al., 2000).

Antígeno e/ou ácido nucléico de PCV-2 têm sido encontrado em tecidos de animais com a síndrome e associado a lesões dos rins. Estudos retrospectivos na Irlanda do Norte demonstraram que a associação desse agente com a síndrome data desde 1990 (ALLAN et al., 2000; GRESHAM et al., 2000; ROSELL et al., 2000). No entanto, alguns trabalhos sugerem que outros agentes como PRRSV e *Pasteurella multocida* podem estar associados à PDNS (LAINSON et al., 2002; ROSELL et al., 2000; THIBAUT et al., 1998).

c) Distúrbios reprodutivos

O envolvimento de PCV-2 em distúrbios reprodutivos foi descrito primeiramente em duas granjas do Canadá em 1999. Posteriormente, relatos semelhantes foram realizados em Iowa, oeste da Europa e Coreia (HARDING, 2004; LYOO; PARK; PARK, 2001; WEST; BYSTROM; WOJNAROWICS, 1999).

As granjas acometidas apresentam taxas elevadas de abortamento, fetos mumificados e leitões natimortos. O PCV-2 é detectado nos tecidos fetais e lesões cardíacas de leitões com miocardites através das técnicas de PCR, imunohistoquímica e isolamento viral (O'CONNOR et al., 2001; WEST; BYSTROM; WOJNAROWICS, 1999).

A ausência de ácido nucléico e/ou antígeno de PCV-2 em amostras de tecidos enviadas para a Universidade de Saskatchewan, entre 1995 e 1998, oriundas de granjas com

distúrbios reprodutivos, mostrou que esta associação de PCV-2 é uma manifestação clínica recente (BOGDAN et al., 2001).

d) Complexo respiratório suíno

O complexo respiratório suíno (PRDC) caracteriza-se por crescimento vagaroso e irregular, redução no consumo alimentar, alta conversão alimentar, tosse e pneumonia, acometendo leitões entre 16 e 20 semanas de idade. Os principais patógenos envolvidos no desenvolvimento do complexo são PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. No entanto, outros agentes, também, foram detectados em surtos de PRDC, dentre eles o PCV-2 (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

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

Na maioria dos casos de PRDC observa-se a co-infecção de PCV-2 com PRRSV, influenza vírus suíno e *Mycoplasma hyopneumoniae*. No entanto, ressalta-se que a associação entre PCV-2 e PRRSV tornam o quadro da doença mais severo (HARMS et al., 2001).

e) Pneumonia proliferativa e necrosante

A pneumonia proliferativa necrosante (PNP) foi descrita pela primeira vez em 1990, no Canadá como uma condição associada com problemas respiratórios em unidades de desmame e terminação (MORIN et al. 1990).

O diagnóstico baseia-se em critérios histopatológicos incluindo a presença de células necróticas, macrófagos e bronqueolite necrosante (LAROCHELLE; SAUVAGEAU; MAGAR, 1994).

No início dos anos 90, uma nova variante do vírus Influenza Suíno (SIV) foi descrito como agente causal da PNP. No entanto, a freqüente detecção de PRRSV no pulmão de animais com PNP fizeram com que o PRRSV fosse considerado o agente primário ou de predisposição na etiologia da PNP (GIRARD; MORIN; EIAZHARY, 1992; LAROCHELLE; SAUVAGEAU; MAGAR, 1994).

Recentemente, o PCV-2 foi associado a PNP através de um trabalho realizado por Pesch et al. (2000). Os autores analisaram, por PCR para PRRSV, PCV-2 e SIV, 192 pulmões com suspeita de PNP. Deste total, 164 pulmões (85,4%) apresentaram co-infecção de PRRSV e PCV-2.

f) Tremor congênito

Tremor congênito (CT), também denominado mioclonia congênita caracteriza-se pelo tremor da cabeça e pernas de leitões recém-nascidos. O tremor congênito divide-se em

dois tipos (A e B) baseados na presença (A) ou ausência (B) de mielina no sistema nervoso central ou periférico. (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

O ácido nucléico do PCV-2 foi detectado em tecido neural e fígado de animais com CT, permitindo a associação do agente com a enfermidade (STEVENSON, et al., 2001).

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Métodos diretos

a) Isolamento

O diagnóstico da infecção por PCV-2 pode ser realizado mediante isolamento viral de amostras de pulmão, amígdala, timo, baço, íleo, linfonodos, fígado e rim. Neste caso, culturas celulares de rim de suíno PK-15 não infectadas com PCV-1 são utilizadas (ATCC-CCL-33). As técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase são utilizadas para a confirmação do isolamento, pois o agente não produz efeito citopático detectável nos cultivos celulares (ALLAN; ELLIS, 2000).

b) Detecção de antígenos e ácidos nucléicos

Diante das dificuldades associadas com o isolamento de PCV-2 em culturas de células, têm-se priorizado estudos conduzidos com métodos diagnósticos que visam à detecção de antígenos ou DNA virais (ALLAN; ELLIS, 2000).

A hibridização *in situ* baseia-se na utilização de sondas de ácidos nucléicos com ou sem marcadores radioativos para localizar seqüências específicas de DNA/RNA em tecidos ou células. Essa técnica foi utilizada para detectar PCV-2 em lesões histológicas da SRM, inclusive em tecidos emblocados em parafina, permitindo a realização de estudos retrospectivos (CHOI; CHAE, 1999; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) consiste na amplificação enzimática *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase, de um fragmento específico do material genético do organismo pesquisado (THOMPSON et al., 2000b).

Esta técnica tem sido utilizada para detectar fragmentos específicos do DNA de PCV-2 a partir de diversas amostras, como sangue total, soro, secreções orofaríngeas e nasais, fezes, sêmen e de tecidos fixados em formol. O uso de materiais antigos fixados, também, permitiu a realização de estudos retrospectivos para o PCV-2 (KIM; CHAE, 2001; KIM et al., 2001; SHIBATA et al., 2003).

A *nested*-PCR (*n*-PCR) permite, com o uso de *primers* internos, amplificar uma região interna a amplificada anteriormente pela PCR, aumentando assim a sensibilidade analítica da técnica. Essa variação da PCR tem sido utilizada para detectar PCV-2 em amostras fixadas em formol (KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA et al., 2002).

A técnica de RFLP-PCR caracteriza-se pelo polimorfismo no comprimento de fragmento obtidos por corte da fita de DNA com enzimas de restrição. Esse polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos luminescentes. Diferenças na seqüência de DNA resultante de inserções, deleções ou outros rearranjos que alteram as distâncias entre pares de sítios de restrição e geram fragmentos de tamanho diferentes. Essa técnica tem sido utilizada para detectar e diferenciar PCV-1 e 2 (CIACCI-ZANELA et al., 2001; HAMEL et al., 2000).

A técnica de *multiplex*-PCR (*m*-PCR) utiliza pares de *primers* para diferentes agentes numa mesma reação de PCR, resultando em fragmentos de tamanho diferentes para cada agente. Essa técnica permite a detecção de dois ou mais agentes numa mesma reação e tem sido utilizada para detectar simultaneamente PCV-1 e PCV-2, ou PCV-2 e PPV em amostras de sêmen, baço e linfonodo (KIM et al., 2001; CHOI et al., 2002; LAROCHELLE et al., 1999; OUARDANI et al., 1999).

2.4.2 Métodos indiretos

A detecção de anticorpos no soro de suínos para PCV-2 pode ser realizada pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), imunoperoxidase (IP) e ELISA, sendo a IFI e IP as mais comumente utilizadas (ALLAN et al., 1999; BLANCHARD et al., 2003;

NAWAGITGUL et al., 2002; RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2000). A técnica de IFI com anticorpos monoclonais permite, ainda, a classificação antigênica em PCV-1 e 2 (ALLAN et al., 1999).

Métodos de ELISA utilizando como antígeno suspensão viral oriunda de células infectadas com PCV-2 (ELISA-PCV-2) e proteína recombinante da região ORF-2 do PCV-2 (ELISA-ORF-2) foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-PCV-2. Esses métodos, quando comparados com a técnica de IFI, apresentaram uma acurácia, sensibilidade e especificidade diagnóstica maiores que 90% (NAWAGITGUL et al., 2002).

ELISA indireto, utilizando uma proteína do capsídeo viral codificada pela ORF-2 do PCV-2, foi desenvolvido para detectar anticorpo anti-PCV-2 em suínos. A sensibilidade e a especificidade diagnóstica, quando comparadas com o teste de IP, foram de 98,2% e 94,5%, respectivamente (BLANCHARD et al., 2003).

2.5 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO CIRCOVÍRUS SUÍNO

O genoma do Circovírus suíno apresenta uma molécula de DNA de fita simples ambisenso, circular, fechada por uma ligação covalente, formada por aproximadamente 2000 nucleotídeos. Essa estrutura compacta tem uma região intergênica na qual são flanqueadas, arranjadas de forma circular, as duas principais fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORF) denominadas ORF - 1 e 2 (Figura 1). Além dessas duas principais ORFs, que serão

discutidas com mais detalhes adiante, outras dez ORFs (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) foram mapeadas. No entanto, as funções das proteínas codificadas por essas regiões ainda não foram descritas (HAMEL; LIN; NAYAR, 1998; MANKERTZ et al., 2004).

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

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

O gene *rep* localiza-se na fita viral no sentido horário (5'-3') e codifica as duas principais proteínas envolvidas na replicação a Rep e Rep'. Dois transcritos co-lineares são sintetizados pelo gene *rep*: (i) o primeiro compreende totalmente a ORF-1 com 945nt que codifica a Rep com 315aa e (ii) o segundo transcrito sofre um *splicing*, resultando na Rep' com 168aa (Figura 2) (CHEUNG, 2003).

A origem da replicação, localizada na região intergênica do genoma do PCV-2, tem aproximadamente 84nt, do nucleotídeo 1735 ao 1768 e do nucleotídeo 1 ao 51 (Figura 1). Essa região é formada por uma região palindrômica, um octanucleotídeo (5' AGT ATT AC 3') e quatro repetições do hexâmero 5' CGG CAG (Figura 1) (CHEUNG, 2004; MANKERTZ et al., 2004).

Três domínios típicos de enzimas iniciadoras, os *motifs* 1, 2 e 3 e a alça P (*P-loop*) para ligação com o sítio de dNTP são elementos tipicamente encontrados em microorganismos que utilizam o modelo de replicação círculo rolante (*rolling circle*). A função do *motif* 1, ainda não está bem esclarecida. O *motif* 2 está envolvido na coordenação dos cátions divalentes Mg^{2+} ou Mn^{2+} através do resíduo histidina, que é invariável. O *motif* 3 é necessário para iniciar a atividade de replicação através do resíduo invariável de tirosina. Esses três *motifs* são necessários para iniciar a replicação da fita de DNA positiva *in vivo*. Os domínios A e B, do sítio de ligação dNTP, contribuem com a atividade da ATPase. Mutações nessas regiões comprometem a atividade intrínseca da ATPase, influenciando negativamente na atividade da Rep na replicação viral (GUTIERREZ, 1999). No PCV-2 os três domínios de enzimas iniciadoras e os sítios de dNTP (A e B) encontram-se no gene *rep* e são altamente conservados (NIAGRO et al., 1998; MANKERTZ et al., 2004).

A análise das seqüências de nucleotídeos do genoma total do PCV-2 revela uma identidade de aproximadamente 95% entre os isolados. Quando o PCV-2 é comparado ao PCV-1, o genoma total apresenta identidade entre 68 e 76%. Comparando as ORFs-1 e 2, a identidade nucleotídica entre PCV-1 e 2 é de 83% e 67% e a de aminoácido de 86% e 63%, respectivamente (ALANN; ELLIS, 2000).

A variabilidade intrínseca entre as amostras de PCV-2 de vários países resultou em dois “subtipos” proposto por Jemeršić et al. (2004). Os autores analisaram uma seqüência de 501 nucleotídeos da ORF-2 que resultou na formação de dois grandes grupos. O primeiro subgrupo, PCV-2a, compreende as amostras do Canadá, Alemanha, Espanha, Eslovênia e Taiwan. O segundo, PCV-2b, agrupa as amostras da França, China, Reino Unido Eslovênia e Países Baixos. A análise de seqüências de 1768nt de PCV-2 realizadas em amostras tailandesas, também, mostram a subdivisão em dois subtipos (WANG et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 Padrão positivo utilizado no desenvolvimento da PCR para detecção de PCV-2

A amostra padrão constituiu-se de um plasmídeo pEGFP-C2 com marcador de kanamicina contendo um fragmento de 702pb correspondente a ORF-2 do genoma do PCV-2. Este material foi gentilmente cedido pela Dra. Annette Mankertz do Instituto Robert-Koch de Berlim/Alemanha.

A inserção dos plasmídeos em *Escherichia coli* DH5 α foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análise Clínica e Tóxica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Posteriormente, o inserto foi extraído e purificado das bactérias *E. coli* DH5 α transformadas com o kit *Concert rapid plasmid purification system* (GIBCO BRL products) seguindo as instruções do fabricante e utilizados como controle positivo nas PCR para detecção de PCV-2.

3.1.2 Amostras de clínicas

Durante o período de abril de 2001 a outubro de 2004, 870 amostras clínicas de suínos foram enviadas ao laboratório pelas seguintes instituições: a) Laboratório de Patologia Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP; b) Laboratório de Suínos do Instituto Biológico do Estado de São Paulo; c) granjas de suínos nas imediações de São Paulo e da região Itapeva/SP e d) abatedouro localizado nas imediações da cidade de São Paulo.

Deste total, 20 amostras de campo de suínos foram positivas para PCV-2 pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), sendo 15 pelo par de *primers* F66/B67 (MANKERTZ et al., 2000) e 5 pelo par Fa2/Ra2, que foi desenhado no nosso laboratório (Quadro 1). Essas amostras positivas tiveram a ORF-1 ou ORF-2 ou ambas seqüenciadas, conforme descrito no quadro 1.

No esquema apresentado da amostra 16 (Figura 3) representamos as seguintes regiões: (i) ORF-1 que codifica a proteína Rep envolvida na replicação viral; (ii) ORF-2 que codifica a proteína estrutural Cap formadora do capsídeo; (iii) região não codificadora que intercala as ORF-1 e 2 e contém a origem da replicação, denominada IGS-1 e (iv) região não codificadora que intercala a as ORF-1 e 2, denominada IGS-2. Esse esquema foi utilizado como modelo para localização das regiões seqüenciadas das 20 amostras positivas.

As amostras constituíram-se de homogeneizados de órgãos (*pool*) ou linfonodo mediastínico (Quadro 1), que foram maceradas em um homogeneizador de órgãos (Stomacher 80 Seward/Lab System) em 20% (p/v) em TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0),

aliquotadas em microtubos de 1500µL e armazenadas -20°C até o momento da extração do ácido nucléico.

Identificação	Par de Primers	Localização da região sequenciada*	Estado	Material empregado	Idade do animal (dias)	Ano de coleta
Amostra 16	F66/B67	33:1004 – 1005:1757	SC	<i>pool**</i>	45	2004
Amostra 22	F66/B67	43:1004 – 1005:1757	MG	<i>pool</i>	55-60	2004
Amostra 21	F66/B67	37:1004 – 1005:1749	MG	<i>pool</i>	55-60	2004
Amostra 15	F66/B67	44:1000 – 1030:1737	MG	<i>pool</i>	55-60	2004
Amostra 9	F66/B67	36:1004 – 1005:1756	MG	<i>pool</i>	45-50	2003
Amostra 7	F66/B67	43:1004 – 1005:1757	SC	<i>pool</i>	70	2002
Amostra 5	F66/B67	44:1000 – 1032:1737	SC	<i>pool</i>	50	2003
Amostra 4	F66/B67	41:1004 – 1005:1757	SC	<i>pool</i>	45	2003
Amostra 3	F66/B67	44:1004 – 1005:1756	SC	<i>pool</i>	63	2003
Amostra 2	F66/B67	36:1004 – 1005:1750	nd	<i>pool</i>	nd	2002
Amostra 23	F66/B67	42:1004 – 1020:1450	SP	<i>pool</i>	70	2003
Amostra 6	Fa2/Ra2	810:1004 – 1005:1749	SC	<i>pool</i>	70	2002
Amostra 10	F66/B67	811:1004 – 1005:1752	MG	<i>pool</i>	65	2003
Amostra 13	F66/B67	782:1004 – 1005:1751	MG	<i>pool</i>	55-60	2004
Amostra 39	F66/B67	782:1004 – 1005:1752	SC	<i>pool</i>	42	ND
Amostra C	Fa2/Ra2	780:1004 – 1005:1749	SP	L	A	2003
Amostra D	Fa2/Ra2	815:1004 – 1005:1752	SP	L	A	2003
Amostra 13R	Fa2/Ra2	786:1004 – 1005:1751	SP	L	AR	2002
Amostra 22R	Fa2/Ra2	782:1004 – 1005:1752	SP	L	AR	2002
Amostra 25R	F66/B67	780:1004 – 1005:1750	SP	L	AR	2002

*posições baseadas na sequência do GenBank (n. AY094619 - CHEUNG et al., 2003); ***pool*= fígado, baço e rim; A= peso de $\pm$ 95 Kg com idade $\leq$ 150 dias; AR= peso de $\pm$ 95 Kg com idade $>$ 150 dias; nd = nada a declarar

Quadro 1- Informações quanto ao par de *primers*, localização da região sequenciada, Estado, material empregado, idade do animal (dias) e ano de coleta das 20 amostras de suínos positivas de PCV-2 por PCR que tiveram a região ORF-1 ou ORF-2 ou ambas sequenciadas

Figura 3- Representação linear de PCV-2 com as ORF-1 e 2. A localização dos nucleotídeos da amostra 16 (33:1004 e 1005:1757) foi baseada na sequência de PCV-2 do GenBank (acesso: AY094619) (CHEUNG, 2004, adaptado)

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A extração de DNA viral deu-se a partir de suspensão a 20% (p/v) de linfonodo mediastínico ou *pool*, utilizando-se isotiocianato de guanidina/glicogênio (CHOMKZYNSKI, 1993) seguindo as etapas de execução descritas a seguir.

Duzentos microlitros de amostra foram adicionados a 600µL de isotiocianato de guanidina/glicogênio em um microtubo de 1500µL. Após homogeneização, adicionaram-se 100µL de clorofórmio. O material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x g por cinco minutos para separar as fases. A fase aquosa, resultante da fase anterior, foi transferida para outro microtubo de 1500µL, misturado com 600µL de propanol, homogeneizado por inversão e incubado por um período mínimo de duas horas a -20°C. Após esse período, o material foi

centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 25 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado com 500µL de etanol 70%, centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, novamente, por inversão. O sedimento foi seco em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10 minutos, suspenso em 30µL de TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e incubado em placa aquecida (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10 minutos. O DNA viral foi mantido a -20°C até o momento do uso.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

a) Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os pares de *primers* utilizados no trabalho estão descritos no quadro 2. Seis pares de *primers*, Fa2/Ra2, Fb2/Rb2, Fc2/Rc2, Fd2/Rd2, Fe2/Re2 e Ff2/Rf2, foram desenhados no laboratório com a finalidade de abranger todo o genoma do PCV-2, conforme demonstrado na figura 4.

Para isso, seqüências disponibilizadas no GeneBank (números de acesso: AF027217; AF055391; AF055392; AF055393; AF055394; AF109398; AF109399; AF112862; AF117753; AF118097; AF201305; AF201306; AF201307; AF201308; AF201309; AF201310; AF201311; AF201897; AF264038; AF264039; AF264040; AF264041;

AF264042; AF264043; AF454546; AY035820; AY094619; AY099495; AY099496; AY099497; AY099498; AY099499; AY099501; AY122275; AY146991; AY146992; AY146993; AY177626; AY180396; AY180397; AY181945; AY188355; AY217743 e Y09921) foram alinhadas através do Programa BioEdit v 7.0.1 (HALL, 1999). Regiões conservadas do genoma foram escolhidas como alvo para o desenho dos pares de *primers*, descritos no quadro 2, utilizando para tanto o sítio www.lbm.usp.br.

A otimização das temperaturas de hibridação dos *primers* desenhados foi realizada em termociclador com gradiente e as melhores temperaturas estão descritas no quadro 4.

<i>Primer</i>	Alvo	Seqüência 5' - 3'(nt)	Região de hibridação*	Fragmento (pb)
F66/	ORF-2	GGT TTG TAG CCT CAG CCA CCG C	1169-1190	415
B67	ORF-2	GCA CCT TCG GAT ATA CTG TCA AGG	1584-1561	
Fa2/	ORF-1	ATTACCAGCAATCAGACCCCGT	807 - 828	476
Ra2	ORF-2	CAACCCTTCTCCTACCACTCC	1282 - 1262	
Fb2/	ORF-2	CGGATATTGTAGTCCTGGTCG	1095 - 1115	338
Rb2	ORF-2	AAGGTTGAATTCTGGCCCTGC	1432 - 1412	
Fc2/	ORF-2	TATGGCGGGAGGAGTAGTTTA	1291 - 1311	467
Rc2	ORF-2	CGCACTTCTTTCGTTTTTCAG	1757 - 1738	
Fd2/	ORF-1	GCA CCT CAG CAG CAA CAT	35 – 52	476
Rd2	ORF-1	CGC TTC TGC ATT TTC CCG	538 - 521	
Fe2/	ORF-1	AGT CTG GTG ACC GTT GC	780 – 796	338
Re2	ORF-1	GGG TCT GAT TGC TGG TA	1141 - 1125	
Ff2/	ORF-1	GTA CCT TTT TTG GCC CG	441 – 457	467
Rf2	ORF-2	GGC ACT GCG TTC GAA AA	825 - 809	

Quadro 2- Seqüência dos pares de *primers* F66/B67 (detecção), Fa2/Ra2 (detecção e seqüenciamento), Fb2/Rb2, Fc2/Rc2, Fd2/Rd2, Fe2/Re2 e Ff2/Rf2 (seqüenciamento) de PCV-2, localização da região de hibridação e os respectivos valores do tamanho dos fragmentos amplificados. Localização dos nucleotídeos baseado na seqüência do GenBank (n. acesso AF027217)

Figura 4- Mapa linear de PCV-2 e localização esquemática dos *primers* para seqüenciamento da ORF-1 e 2 (CHEUNG, 2004, adaptado)

b) Condições de amplificação

As PCRs foram conduzidas utilizando-se 5µL de DNA extraído num volume final da reação de 50µL seguindo as concentrações de reagentes descritas no quadro 3. O material foi amplificado em um termociclador automático modelo PTC-200® Peltier Thermal Cycler (MJ Research). O número de ciclos, tempo e as temperaturas utilizadas para cada reação estão descritas no quadro 4.

Reagentes	Concentrações				
	<i>Primers</i> F66/B67	<i>Primers</i> Fa2/Ra2	<i>Primers</i> Fb2/Rb2	<i>Primers</i> Fc2/Rc2	<i>Primers</i> Fd2/Rd2 Fe2/Re2 Ff2/Rf2
dNTP's	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
<i>Reaction Buffer</i> *	1x	1x	1x	1x	1x
<i>Primers</i> **	50pmoles	50pmoles	50pmoles	50pmoles	25pmoles
DMSO	nd	10%	nd	nd	nd
MgCl ₂	1,25mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM	1,5mM
Enzima ***	1,5U	1,5U	1,5U	1,5U	2,5U

*Gibco BRL-Gaytherburg/USA; **Os *primers* utilizados estão descritos no quadro 2; ***Taq DNA polimerase platinum (Gibco BRL-Gaytherburg/USA); nd = nada a declarar

Quadro 3- Reação utilizada para amplificar diferentes fragmentos de PCV-2

<i>Primers</i>	Desnaturaçãoinicial	40 X			Extensão final
		Desnaturaçãode DNA	Hibridaçãodos <i>primers</i>	Polimerizaçãodo DNA	
F66/B67	95°C/5 min	95°C/1 min	56°C/1 min	72°C/2 min	72°C/5 min
Fa2/Ra2	95°C/5 min	95°C/30s	51°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min
Fb2/Rb2	95°C/5 min	95°C/30s	58°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min
Fc2/Rc2	95°C/5 min	95°C/30s	60°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min
Fd2/Rd2	95°C/5 min	95°C/30s	51°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min
Fe2/Re2	95°C/5 min	95°C/30s	51°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min
Ff2/Rf2	95°C/5 min	95°C/30s	51°C/30s	72°C/30s	72°C/5 min

Quadro 4- Condições utilizadas para amplificar diferentes fragmentos de PCV-2

c) Detecção do produto amplificado

Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 2% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045M Tris-Borato, 1mM EDTA) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As dimensões dos amplificados foram comparadas a um padrão disposto no gel juntamente com as amostras analisadas, a cada corrida eletroforética. Os géis foram fotodocumentados com a câmara Kodak Digital Science DC 40.

3.4 SEQÜENCIAMENTO

a) Purificação e quantificação dos produtos amplificados para seqüenciamento

Os fragmentos de DNA alvo foram submetidos a uma migração eletroforética em gel de agarose a 1,5% e purificados com o *kit* comercial GFX PCR DNA *Gel Band Purification Kit* (Amershan Pharmacia Biotech®) de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade de purificação e quantificação do DNA foi verificada em outra corrida eletroforética com 5µL de DNA purificado por caneta juntamente com o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA). Após a corrida, compararam-se, visualmente, as intensidades das bandas obtidas do DNA purificado com aquelas do padrão, utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se desta forma a concentração de DNA em ng/µL.

b) Reação de seqüenciamento

Os fragmentos amplificados pela PCR seguido da purificação e quantificação foram utilizados nas reações de seqüenciamento automático. Num volume final de 10µL foram utilizados 1µL de *Big Dye v 3.1 (TM Terminator-cycle sequencing ready reaction* - Applied Biosystems), 2µL de tampão *Save Money 5x* (200mM de Tris, 5mM de MgCl₂, pH 9,0), 10pmoles do *primer* (Quadro 2) e 24ng de DNA purificado. Quando a concentração do DNA das amostras foi abaixo de 4ng/µL, o volume final da reação foi dobrada, assim como a concentração dos reagentes, exceto a do *primer* utilizado.

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

c) Purificação do produto com bases marcadas

A purificação dos múltiplos DNAs de fita única contendo nucleotídeos marcados processou-se conforme descrito a seguir.

Para cada 10µL do produto das reações de seqüenciamento foram adicionados 40µL de isopropanol a 65%, homogeneizado gentilmente e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14.000 x g durante 25 minutos; o sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, por inversão e o sedimento lavado com 300µL de etanol a 70%. Depois o material foi centrifugado a 14.000 x g durante 10

minutos, o sobrenadante descartado com o auxílio de pipeta e o sedimento aquecido no termobloco a 82°C por dois minutos para evaporar o etanol residual. Esse material foi armazenado a -20°C.

No instante em que as amostras foram colocadas no aparelho ABI PRISM™ 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, USA), essas foram suspensas em 3,4µL da solução contendo formamida e *Blue Dextran*-EDTA (Applied Biosystems, USA) na proporção de 5:1. Posteriormente, esse material foi desnaturado a 95°C por dois minutos e colocado em gelo por mais dois minutos. Aplicaram-se 1,5µL desse material no gel de seqüenciamento.

3.5 ANÁLISE FILOGENEALÓGICA

a) Montagem das seqüências consensos

Após determinar as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados pela reação de PCR (item 3.3) através da reação de seqüenciamento (item 3.4), as mesmas foram submetidas ao programa computacional PHRED (<http://bioinformatica.ucb.br/electro.html>) para análise da qualidade da leitura dos cromatogramas. Como critério de validação de qualidade, somente as leituras que tiveram pontuação maior ou igual a 20 foram aceitas.

O ponto de corte maior ou igual a 20 significa que a probabilidade de determinada base estar errada é de uma em mil. Após a análise de qualidade de cada uma das seqüências senso e anti-senso de cada amostra, as seqüências consenso foram geradas com o auxílio do programa computacional CAP3 (<http://bioinformatics.iastate.edu/aat/sas.html>).

b) Alinhamento das Seqüências

O alinhamento das seqüências foi obtido com o auxílio do programa BioEdit v 7.0.1 (HALL, 1999). As seqüências utilizadas como referência foram obtidas no GenBank. Os números de acesso foram: (i) PCV-2 de outros países: Estados Unidos (AF147751), Canadá 1 (AF027217), Canadá 2 (AF085695), Canadá 3 (AF1180972), Reino Unido (AJ293869), África do Sul (AY325495), Taiwan (AF166528), China 1 (AY682997), China 2 (AF381176), Japão (AB072303), Áustria 1 (AY424403) e Áustria 2 (AY424405); (ii) PCV-2 associados às sinais clínicos: Abortamento 1 (AJ293867), Abortamento 2 (AJ293868), Tremor Congênito (AY099499), SRM (AF05539) e PDNS (AJ293869) e (iii) Circovírus suíno tipo 1 (PCV-1) (AY184287) utilizado como grupo externo.

No alinhamento de seqüência parcial das amostras de PCV-2 em estudo, foram utilizadas as mesmas seqüências acima, com algumas exceções descritas a seguir: (i) na análise da ORF-1 das amostras em estudo e de outros países não foi utilizada a seqüência Canadá 3; (ii) na análise da ORF-2 não foram usadas às amostras Reino Unido e Taiwan e (iii) na análise da ORF-2 não foi realizada com amostras associadas a sinais clínicos (Abortamento 1 e 2, SRM, PDNS e CT).

c) Determinação do Modelo Evolutivo de Substituição Nucleotídica

Para determinar o modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais adequado para o conjunto de seqüências analisadas, utilizou-se o teste de razão de verossimilhança (HUESELENBECK; RANNALA, 1987) com o auxílio do programa computacional ModelTest (POSADA; CRANDALL, 1988).

d) Análise Genealógica

As análises genealógicas das seqüências nucleotídicas pelo método de distância *Neighbor-Joining* (NJ) com busca exaustiva e sem atribuição de peso aos caracteres, os quais foram considerados como não ordenados, foram realizadas através do programa Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v 2.0 (KUMAR et al., 2000) e Paup v 4 (SWOFFORD, 2002).

Os valores de consistência das árvores e de *Bootstrap* foram obtidos através dos programas Mega v 2.0 (KUMAR et al., 2000) e Paup v 4 (SWOFFORD, 2002). O teste de *Bootstrap* foi realizado com 1000 réplicas através do método de busca heurística.

A formatação e esquematização das árvores genealógicas propostas foram realizadas com o auxílio do programa *Tree Explorer* (KUMAR et al., 2000).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADO DA PCR DAS AMOSTRAS CLÍNICAS PARA PCV-2

Do total de 870 animais testados durante o período de abril de 2001 a outubro de 2004, 20 (2,3%) foram positivos para PCV-2. Destes, 15 foram detectados com o par de *primers* F66/B67 (MANKERTZ et al., 2000) e 5, escolhidos aleatoriamente entre as 870 amostras de suínos enviadas para o laboratório, com o par de *primers* Fa2/Ra2, o qual foi desenhado em nosso laboratório durante o experimento.

Com relação à idade dos animais, o PCV-2 foi detectado em nove animais da categoria maternidade (≤ 60 dias), seis animais do crescimento (> 60 dias) e cinco animais de abate, sendo três refugo (95Kg e idade ≥ 150 dias) e dois normais (95Kg e idade < 150 dias).

Com relação à origem, do total de 20 animais PCV-2 positivos, seis foram do Estado de São Paulo, seis de Minas Gerais, sete de Santa Catarina e um de origem desconhecida.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As seqüências nucleotídicas das amostras em estudos foram determinadas a partir dos produtos obtidos das PCRs com os pares de *primers* desenhados no nosso laboratório, conforme demonstrados na figura 4 (3.3). Essas seqüências foram analisadas com o programa computacional PHRED (<http://bioinformatica.ucb.br/electro.html>) com padrão de qualidade ≥ 20 e as seqüências consenso montadas através do programa computacional CAP 3 (<http://bioinformatics.iastate.edu/aat/sas.html>).

As regiões seqüenciadas das amostras estão descritas a seguir:

a) Oito amostras, denominadas amostras completas (2, 3, 4, 7, 9, 16, 21 e 22), tiveram mais de 1705 nucleotídeos (nt) seqüenciados, dos quais 945 e 699 correspondem às regiões ORF-1 e ORF-2, respectivamente. O restante está dividido entre as regiões IGS-1 e IGS-2, que tiveram valores médios de 21nt e 39nt, respectivamente.

b) Duas amostras (5 e 15) tiveram em média 1692nt seqüenciados, dos quais 945 e 699 correspondem a ORF-1 e ORF-2, respectivamente. O restante está dividido entre as regiões IGS-1 e IGS-2, que apresentaram valores médios de 38nt e 14nt, respectivamente.

c) Uma amostra teve 1392nt seqüenciados (945nt da ORF-1; 414nt da ORF-2; 9nt da IGS-1 e 24nt da IGS-2).

d) Nove amostras tiveram em média 970nt seqüenciados, dos quais 196nt e 699nt correspondem a ORF-1 e 2, respectivamente. O restante está dividido entre as regiões IGS-1 e 2 tiveram valores médios de 15nt e 39nt, respectivamente.

Portanto, a partir dessas 20 amostras em estudos, foram obtidos: oito seqüências totais, 11 seqüências de ORF-1 e 19 seqüências de ORF-2, as quais foram analisadas. Nessas amostras não foi detectada nenhuma *indel* (inserção/deleção).

4.3 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

a) Amostras de PCV-2 completamente seqüenciadas

As substituições de nucleotídeos (Apêndice A) e aminoácidos encontradas nas oito seqüências de 1705nt estão descritas no quadro 5.

Amostras	Posição do nucleotídeo*	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
2, 3, 4, 7 e 21	68	<u>CTG</u> → <u>TTG</u>	transição	sem substituição
4	125	<u>TTT</u> → <u>TTC</u>	transição	sem substituição
21	191	<u>CTC</u> → <u>CTT</u>	transição	sem substituição
2, 3, 4, 7 e 21	320	<u>ATG</u> → <u>GTG</u>	transição	M→V
21	892	<u>ACG</u> → <u>ATG</u>	transição	T→M
2, 3, 4, 7 e 21	1518	<u>GCT</u> → <u>GTT</u>	transição	A→V
4	1527	<u>TAT</u> → <u>TGT</u>	transição	Y→C

* Posição do nucleotídeo que inicia o códon

Quadro 5- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as oito amostras brasileiras de PCV-2 completas

A identidade entre as oito amostras de PCV-2 variou de 99,7% a 100%. As amostras 9, 16 e 22 apresentaram identidade de 100% entre si, assim como as amostras 3, 2 e 7.

Essas amostras foram comparadas às disponíveis no GenBank e verificou-se que em relação às amostras: (i) da África do Sul a identidade foi de 95% (ii) da América (Canadá e Estados Unidos) a identidade variou de 94,9% e 95,8%; (iii) da Ásia (China, Japão e Taiwan) a identidade variou entre 95,2% e 99,5% e (iv) da Europa (Áustria, Hungria e Reino Unido) a identidade variou de 95,1% e 99,7% (Apêndice B).

As regiões dos *motifs* 1, 2 e 3 e as duas regiões de sítio de ligação dNTP, comumente encontradas em agentes que utilizam o modelo de replicação círculo rolante, foram alinhadas com PCV-2 de diferentes países (África do Sul; Áustria 1 e 2; Canadá 1, 2 e 3; China 1 e 2; Estados Unidos; Hungria; Japão, Reino Unido e Taiwan). Nas duas regiões de sítio de ligação dNTP não foi encontrado nenhuma substituição de nucleotídeo nas amostras comparadas (Apêndice C). Nas outras três regiões as substituições de nucleotídeos encontradas não resultaram em substituição de aminoácido e estão descritas no quadro 6.

Região	Amostras	Posição do nucleotídeo*	Substituição de nucleotídeo
Motif 1	2, 3, 4, 7 e 21	68	<u>CTG</u> → <u>TTG</u>
	China 2	68	<u>CTG</u> → <u>CTC</u>
	África do Sul, Áustria, Canadá (1, 2 e 3), China 2, Estados Unidos e Taiwan	67	<u>ACT</u> → <u>ATG</u>
Motif 2	Austria 1 e Taiwan	175	<u>CCT</u> → <u>CCC</u>
	Taiwan	181	<u>CTC</u> → <u>CTA</u>
	21		<u>CTC</u> → <u>CTT</u>
Motif 3	África do Sul, Canadá (1, 2 e 3), China 2, Estados Unidos e Japão	295	<u>TAC</u> → <u>TAT</u>

* Posição do nucleotídeo que inicia o códon

Quadro 6- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos nas regiões *Motif* 1, 2 e 3 entre as oito amostras brasileiras de PCV-2 e de diferentes países

Quatro amostras de PCV-2 em estudo (3, 4, 16 e 21) foram alinhadas com as amostras de Circovírus de columbídeos (CoCV n. acesso: NC002361) e Vírus da Doença dos Bicos e Penas (BFDV n. acesso: AF0718781). Nesse alinhamento observaram-se várias substituições de nucleotídeos nas regiões *motif* 1, 2 e 3 e nos dois *motif* de ligação dNTP (A e B). No entanto, essas substituições foram do tipo silenciosas, não alterando os aminoácidos dessas regiões (Apêndice D).

A árvore para demonstrar a relação genealógica entre amostras de PCV-2 em estudo e de outros países, usando sequência de 1705nt, foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,32) com um *bootstrap* de 1000 replicas (Figura 5). As amostras de PCV-2 brasileiras resultaram em um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 85%, juntamente com as amostras Áustria 2, China 1, Hungria e Reino Unido. Um outro grupo, suportado por um valor de *bootstrap* de 96%, foi formado pelas sequências África do Sul, Áustria 1, Canadá (1, 2 e 3), China 2, Estados Unidos, Japão e Taiwan.

Figura 5- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando as seqüências de 1705nt. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,32). Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)

b) ORF-1 do PCV-2

Do total de 20 amostras positivas, 11 tiveram 945nt seqüenciados (amostras 2, 3, 4, 5, 7, 9, 15, 16, 21, 22 e 23) correspondente a ORF-1. As substituições de nucleotídeos e aminoácidos (Apêndice E) entre as amostras em estudo estão descritas no quadro 7.

Amostras	Posição do códon	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
15	24	<u>A</u> GA→A <u>A</u> A	transição	R→K
9, 16, 22 e 23	63	<u>T</u> TG→ <u>C</u> TG	transição	sem substituição
4	120	TT <u>T</u> →TT <u>C</u>	transição	sem substituição
21	174	CT <u>C</u> →CT <u>T</u>	transição	sem substituição
9, 16, 22 e 23	314	G <u>G</u> T→G <u>A</u> T	transição	V→M
15	840	T <u>C</u> C→T <u>C</u> T	transição	sem substituição
21	876	A <u>C</u> G→A <u>T</u> G	transição	T→M

* Posição do nucleotídeo que inicia o códon

Quadro 7- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-1 de PCV-2 das amostras em estudo

A identidade nessa região entre as 11 amostras de PCV-2 variou entre 99,3% e 100%. As seqüências da ORF-1 dessas amostras foram confrontados com seqüências de diferentes países disponíveis no GenBank, resultando no seguinte: (i) na África do Sul a identidade variou entre 97,6% e 98,0%; (ii) na América (Canadá 1 e 2 e Estados Unidos) a identidade variou entre 96,5% e 98,0%; (iii) na Ásia (China, Japão e Taiwan) a identidade variou entre 97,4% e 99,7% e (iv) na Europa (Áustria, Hungria e Reino Unido) a identidade variou entre 97,5% e 99,8% (Apêndice F).

A identidade dessas amostras em relação às seqüências de PCV-2 associadas a sinais clínicos variou entre 97,6% (SRM, CT, Abortamento 1 e 2) e 99,7% (PDNS) (Apêndice G).

A árvore que mostra a relação genealógica entre a região ORF-1 (945nt) de PCV-2 em estudo e de outros países foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,35) com um *bootstrap* de 1000 replicas (Figura 6). A análise dessa região resultou no mesmo tipo de agrupamento observado na análise da seqüência completa do vírus.

Uma outra árvore foi feita para mostrar a relação genealógica entre a região ORF-1 de PCV-2 em estudo e seqüências associadas a sinais clínicos. O algoritmo usado foi *Neighbor-joining* e o modelo evolutivo utilizado foi o Kimura 2 Parâmetros com um *bootstrap* de 1000 replicas (Figura 7). As seqüências da ORF-1 das amostras de PCV-2 brasileiras resultaram em um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 98%, juntamente com a amostra associada à PDNS. Um outro grupo, suportado por um valor de *bootstrap* de 99%, foi formado pelas seqüências da ORF-1 de amostras associadas a abortamento, SRM e CT.

Figura 6- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando a sequência da ORF-1 (945nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros (gama 0,35). Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)

Figura 7- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de PCV-2 associado sinais clínicos, usando a sequência da ORF-1 (945nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)

c) ORF-2 do PCV-2

Do total de 20 amostras positivas, 19 tiveram 699nt seqüenciados (amostras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13R, 13, 15, 16, 21, 22, 22R, 25R, 39, C e D) correspondente a ORF-2. As substituições de nucleotídeos e aminoácidos (Apêndice H) estão descritas no quadro 8.

Amostras	Posição do códon*	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
6, C, D, 13R e 22R	28	<u>T</u> AC→T <u>T</u> C	transição	Y→F
6, C, D, 13R e 22R	31	CG <u>G</u> →CG <u>C</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	37	<u>A</u> GA→ <u>C</u> GA	transversão	sem substituição
C, D, 13R e 22R	40	AGA→AG <u>G</u>	transição	sem substituição
C, D, 13R e 22R	121	<u>A</u> GA→A <u>A</u> A	transição	R→K
C, D, 13R e 22R	142	A <u>A</u> C→A <u>C</u> C	transversão	N→T
6	145	<u>A</u> CC→ <u>G</u> CC	transição	T→A
4	170	TAT→T <u>A</u> C	transição	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	176	<u>A</u> TC→ <u>G</u> TC	transição	I→V
2, 3, 4, 5, 7, 15 e 21	178	AAG→A <u>A</u> A	transição	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	181	<u>C</u> GA→ <u>G</u> CT	3 transversões	R→A
C, D, 13R e 22R	184	A <u>C</u> C→A <u>G</u> C	transversão	T→S
C, D, 13R e 22R	194	A <u>A</u> A→A <u>C</u> A	transversão	K→T
6	194	A <u>A</u> A→A <u>G</u> C	transição/transversão	K→S
C, D, 13R e 22R	196	AC <u>G</u> →AC <u>A</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	220	<u>A</u> TG→ <u>C</u> TG	transversão	M→L
6, C, D, 13R e 22R	226	T <u>T</u> C→T <u>T</u> T	transição	sem substituição
6	232	<u>A</u> TT→ <u>C</u> TT	transversão	I→L
6	235	<u>A</u> AT→ <u>G</u> AC	2 transições	N→D
6, C, D, 13R e 22R	244	<u>C</u> TT→ <u>G</u> TT	transversão	L→V
6, C, D, 13R e 22R	250	CC <u>A</u> →CC <u>G</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	258	GG <u>C</u> →GG <u>G</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	262	<u>T</u> CA→ <u>A</u> CC	2 transversões	S→T

(continua)

Amostras	Posição do códon*	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
6, C, D, 13R e 22R	268-270	<u>CCC</u> → <u>AAA</u>	3 transversões	P→K
6, C, D, 13R e 22R	271	<u>CGC</u> → <u>ATC</u>	2 transversões	R→I
6, C, D, 13R e 22R	277	<u>GTG</u> → <u>ATA</u>	2 transições	V→I
6, C, D, 13R e 22R	358	<u>GTG</u> → <u>GTT</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R e 22R	361	<u>GGC</u> → <u>GGA</u>	transversão	sem substituição
6	373	<u>GTT</u> → <u>ATT</u>	transição	V→I
6, C, D, 13R e 22R	385	<u>GAT</u> → <u>GAC</u>	transição	sem substituição
6	397	<u>ACA</u> → <u>ATA</u>	transição	T→I
5	403	<u>GCC</u> → <u>GCT</u>	transição	sem substituição
6	412	<u>CTC</u> → <u>CAA</u>	2 transversões	L→Q
C, D, 13R, 22R e 25R	412	<u>CTC</u> → <u>CTA</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	451	<u>ACC</u> → <u>ACA</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	454	<u>ATA</u> → <u>ATC</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	457	<u>ACC</u> → <u>CCC</u>	transversão	T→P
6, C, D, 13R, 22R e 25R	460	<u>CAG</u> → <u>CAA</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	481	<u>CGC</u> → <u>CGT</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	488	<u>TTT</u> → <u>TTC</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	490	<u>ACC</u> → <u>ACA</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	503	<u>GTC</u> → <u>GTT</u>	transição	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	506	<u>CTA</u> → <u>CTT</u>	transversão	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	535	<u>AAC</u> → <u>AAT</u>	transição	sem substituição
6	544	<u>AGA</u> → <u>AGG</u>	transição	sem substituição
15	553	<u>CTG</u> → <u>CTA</u>	transição	sem substituição
6	555	<u>CTG</u> → <u>ATG</u>	transversão	L→M
6, C, D, 13R, 22R e 25R	565	<u>CTA</u> → <u>CTC</u>	transversão	sem substituição
6	571	<u>ACT</u> → <u>ACG</u>	transversão	sem substituição
C, D, 13R, 22R e 25R	571	<u>ACT</u> → <u>ACC</u>		sem substituição
4, 9, 13R, 16, 21, 22R, 22, 25R, 39, C e D	574	<u>GCT</u> → <u>ACT</u>	transição	A→T
6	574	<u>GCT</u> → <u>AGT</u>	transição/transversão	A→S
6	577	<u>GGA</u> → <u>AGA</u>	transição	G→R
C, D, 13R, 22R e 25R	577	<u>GGA</u> → <u>GCA</u>	transversão	G→A

(continuação)

Amostras	Posição do códon*	Substituição de nucleotídeo	Tipo de substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido
6, C, D, 13R, 22R e 25R	583	GTA→GTG	transição	sem substituição
6, C, D, 13R, 22R e 25R	622	ATA→AAA	transversão	I→K
6, C, D, 13R, 22R e 25R	634	GAA→GAC	transversão	E→D
6, C, D, 13R, 22R e 25R	700	AAC→AAA	transversão	N→K
6, C, D, 13R, 22R e 25R	703	CCT→CCC	transição	sem substituição

(Conclusão)

* Posição do nucleotídeo que inicia o códon

Quadro 8- Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito e sublinhado) e de aminoácidos entre as ORF-2 de PCV-2 das amostras em estudo

A identidade nessa região entre as 19 amostras de PCV-2 variou entre 91,9% e 100%. Quando essas amostras foram confrontadas com PCV-2 de outros países verificou-se que em relação às amostras: (i) da África do Sul a identidade variou entre 92,5% e 95,1%; (ii) da América (Canadá e Estados Unidos) variou entre 91,9% e 95,7%; (iii) da Ásia (China e Japão) a identidade variou entre 92,4% e 99,2% e (vi) da Europa (Áustria e Hungria) a identidade variou entre 91,9% e 100% (Apêndice I).

A árvore genealógica que mostra a relação entre a região ORF-2 de PCV-2 em estudo e de outros países foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros com um *bootstrap* de 1000 replicas (Figura 8).

As 11 amostras brasileiras de PCV-2 analisadas se dividiram em dois grandes grupos. O primeiro formado pelas amostras brasileiras 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 21, 22, 25R e 39 e com as amostras Áustria 2, China 1 e Hungria e foi suportado por um valor de *bootstrap* de 72. Nesse grande grupo, a amostra 25R forma sozinha um subgrupo. O segundo grupo compreende

as amostras 6, 13R, 22R, C e D brasileiras e as África do Sul, Áustria 1, Canadá (1 e 2), China 2, Estados Unidos e Japão suportado por um *bootstrap* de 98.

Esse segundo grupo subdivide-se em dois subgrupos. O primeiro compreende as amostras de PCV-2 da África do Sul, Canadá (1 e 2) Japão e USA e o segundo as amostras 6, 13R, 22R, C e D (brasileiras), Áustria 1 e China 2.

Figura 8- Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras de PCV-2 e de outros países, usando a sequência da ORF-2 (699nt). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. Os números representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas)

5 DISCUSSÃO

O Circovírus suíno (PCV-), família *Circoviridae* é considerado um vírus emergente. Descrito em 1974, como contaminante intermitente de cultivo celular (células PK-15), foi considerado não patogênico e denominado inicialmente como np-PCV (PCV-1). Em 1991, um surto da SRM ocorrido no Canadá com a morte de vários suínos detectou-se o PCV. No entanto, esse PCV diferiu genotipicamente e fenotipicamente do np-PCV, sendo então denominado pmws-PCV (PCV-2) (ALLAN; ELLIS, 2000). Desde então o PCV-2 está sendo associado a várias síndromes que resulta em perdas econômicas nas granjas de suínos.

Além da importância econômica, seu estudo tem sido de grande importância no âmbito de diagnóstico, uma vez que o suíno vem ganhando espaço nas pesquisas direcionadas a xenotransplante. A importância de diagnóstico seguro nos órgãos transplantados incentivou pesquisas para o desenvolvimento e padronização de técnicas de alta sensibilidade para detectar o agente, dentre elas a PCR (TUCKER et al., 2003).

O genoma do circovírus, apesar de pequeno, tem sido objeto de estudo devido ao complexo modelo de replicação. As dificuldades para explicar patogenicidade observada em surtos e a detecção do agente em animal sem sinais clínicos (SEGALÉS; DOMINGO, 2002), fez com que estudos direcionados à variabilidade genética e associação à patogenicidade tenham sido realizados e direcionados principalmente à região que codifica a proteína Cap, a ORF-2. O estudo do genoma, também, tem orientado para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que não existem métodos para controlar a disseminação do agente a não ser os de manejo (FENAUX et al., 2004).

No Brasil, o ácido nucléico de PCV-2 foi detectado em animais com SRM, tremor congênito e em animais sadios pela PCR e RFLP-PCR (CASTRO et al., 2004; CIACCI-ZANELLA et al., 2001).

A PCR tem sido utilizada não só para detectar, mas também para diferenciar o PCV-2 do PCV-1 em amostras de sangue total, soro, secreções orofaríngeas e nasais, fezes, sêmen e de tecidos (KIM; CHAE, 2001; KIM et al., 2001; SHIBATA et al., 2003). No presente estudo, o PCV-2 foi detectado pela PCR em 20 (2,3%) animais de um total de 870 analisados. Dentre esses animais positivos, três tinham menos de 60 dias de idade, quatro tinham mais de 60 dias e cinco tinham idade de abate (± 150 dias).

A detecção de PCV-2 em animais entre 33 a 76 dias de idade está de acordo com o observado em outros países da Europa, Ásia, América e Brasil (CIACCI-ZANELLA et al., 2001; GRESHAM et al., 2000; LAROCHELLE; MAGAR; D'ALLAIRE, 2003; MANKERTZ et al., 2000). A detecção em animais sem sinais clínicos tem sido relatada. Isso está relacionado à necessidade de outros agentes, como PPV e/ou PRRSV, para desencadear o quadro clínico da SRM (LAROCHELLE; MAGAR; D'ALLAIRE, 2003; QUINTANA et al., 2001; RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2000).

A detecção do agente em animais na fase de abate foi relatada no Canadá através de sorodiagnóstico e detecção de ácido nucléico (MAGAR; MÜLLER; LAROCHELLE, 2000).

A falha em detectar PCV-2 em fetos abortados, mumificados e natimortos, pode estar associada a três fatores: (i) falha no diagnóstico que será discutida mais adiante; (ii) falha na amostragem e (iii) baixa patogenicidade do PCV-2 no Brasil. Poucos são os trabalhos que relatam a detecção de PCV-2 em fetos abortados, mumificados e natimortos. Infecções experimentais, na qual o PCV-2 foi inoculado em porca prenhe, mostram que o agente tem

capacidade de se multiplicar no feto e causar abortamento (SANCHEZ et al., 2001). O único trabalho que relata a detecção do agente a campo, que foi de 19% dos fetos analisados (4/21), ocorreu em uma granja com histórico de problemas respiratório causados por infecção de PCV-2 (LYOO; PARK; PARK, 2001).

Regiões conservadas entre os vírus que se utilizam o modelo de replicação círculo rolante, foram localizadas com intuito informativo. São elas: *motif* 1, 2 e 3 e sítio de ligação dNTP com *motif* A e B. Essas regiões foram confrontadas com PCV-2 de outros países, CoCv e BFDV e mostraram-se altamente conservadas, apresentando algumas mutações silenciosas de nucleotídeo. Isto confirma a importância dessas regiões na atividade replicativa, na qual mutações poderiam resultar em inatividade viral.

A identidade observada no segmento de 1705 nucleotídeos entre as oito amostras brasileiras foi alta (99,7 a 100%), indicando que essas amostras oriundas dos Estados de Minas Gerais e Santa Catarina são idênticas. A alta identidade entre amostras de um mesmo país pode ser observada, também, entre as amostras Canadenses 1, 2 e 3 que variou entre 98,5 e 99,2%. A análise da variabilidade nucleotídica de países com posições geográficas próximas, como é o caso das amostras da América do Norte (Estados Unidos e Canadá), também resultaram em identidade entre 99,4 e 98,3%.

Mas em regiões geograficamente distantes, como é o caso do Canadá e África do Sul, Canadá e Japão, as seqüências apresentaram identidade de 99%, mostrando que os vírus que circulam nesses continentes são idênticos. No entanto, as identidades encontradas em duas seqüências da China e duas da Áustria mostram que nesses países existem dois subtipos de vírus circulando. Isso pode se confirmar através da relação mostrada pela árvore genealógica, na qual as amostras analisadas formam dois subgrupos: (i) denominado PCV-2a

que compreende amostras África do Sul, Áustria 1, Canadá (1, 2 e 3), China 2, Estados Unidos, Japão e Taiwan e (ii) PCV-2b que compreende as amostras brasileiras (2, 3, 4, 7, 9, 16, 21, e 22) e as amostras Áustria 2, China 1, Hungria e Reino Unido. Essa subdivisão foi proposta por Jemeršić et al. (2004) durante a análise das seqüências da ORF-2 de amostras detectadas na Croácia.

A região ORF-1 do PCV-2 está compreendida no gene *rep* e tem importância na replicação viral. Essa região é altamente conservada entre as amostras de PCV-2 de diversos países utilizados no presente estudo (identidade entre 97,2 e 99,7%) e PCV-1 (identidade 82%) quando comparada a ORF-2. A identidade observada na ORF-1 nas amostras brasileiras (2, 3, 4, 5, 7, 9, 15, 16, 21, 22, e 23) variou entre 99,3 e 100%, sendo idêntica a observada na análise das seqüências completa (1705nt). A análise mostrou uma identidade entre 99,3 e 99,7% entre as amostras em estudo e de PCV-2 associada a PDNS. Apesar dos animais analisados não apresentarem sinais da síndrome, não foi realizado nenhum teste histopatológico nos rins confirmando a ausência de lesões nesses animais. Será interessante que os estudos futuros associassem o agente aos sinais clínicos.

A região ORF-2 do PCV-2, que está compreendida no gene *cap*, codifica a proteína estrutural (Cap) formadora do capsídeo. Essa região é mais variável, mostrando uma identidade entre 92,2% e 99,8% nas amostras de PCV-2 de diversos países utilizados no presente estudo e de 66% em relação ao PCV-1. A identidade observada na ORF-2 entre as amostras brasileiras (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 13R, 15, 16, 21, 22, 22R, 25R, 39, C e D) variou entre 91,9 e 100%. Essa alta variação se deve, principalmente, à inclusão de quatro amostras do Estado de São Paulo (22R, 13R, C e D) e uma de Santa Catarina (6) que foram detectadas pela PCR utilizando o par de *primers* Fa/Ra. Essa mudança ocorreu no final do experimento, durante a escolha da região alvo dos *primers* de seqüenciamento,

onde, através do alinhamento de amostras de PCV-2 disponíveis no GenBank (item 3.3), se verificou que o *primer* F66/B67 encontrava-se numa região que apresentava alta variabilidade (Figura 9). O uso desses *primers* inespecíficos diminuiu a sensibilidade analítica do teste, que se refere a menor quantidade de analito que o teste é capaz de detectar, uma vez independente da quantidade de analito, os *primers* não detectariam. A perda de sensibilidade gerou uma perda de sensibilidade diagnóstica, ocasionando falsos negativos. Esse fato foi confirmado quando cinco amostras, selecionadas aleatoriamente, inicialmente negativas para PCV-2 pela PCR com os *primers* F66/B67 tornaram-se positivas com o uso dos *primers* Fa2/Ra2. Portanto, o número de animais positivos (20/870) está subestimado e estudos futuros poderão mostrar resultados diferentes.

	130	140	150	160	170
					
Taiwan	CACATTTGCCGAG	<i>GGTTTGTAGCCTCAGCCAAAGC</i>	TGATTCC		
amostra 6	CTACTC	G..T...T..C			
amostra C	A.T	G..T...C	T.		
amostra D	A.T	G..T...C	T.		
amostra 13R	A.T	G..T...C	T.		
amostra 22R	A.T	G..T...C	T.		
Primer F66:	GGT TTG TAG CCT CAG CCA AAG C				

	530	540	550	560	570
					
Taiwan	GTAG	<i>CCTCGACAGTATATCCGAAGGTGCG</i>	GGGAGAGGCGGGT		
amostra 6	T		C		
amostra C	C.T				
amostra D	C.T				
amostra 13R	C.T				
amostra 22R	C.T				
Primer B67:	CCT TGA CAG TAT ATC CGA AGG TGC (complemento reverso)				

Figura 9- Alinhamento de amostras de PCV-2 de diferentes países e localização do *primer* F66. Os pontos indicam resíduos idênticos. O *primers* F66/B67 estão representados em negrito e itálico

A análise genealógica da ORF-2 das 19 amostras brasileiras de PCV-2 mostra a divisão em dois grandes subgrupos: (i) PCV-2b compreende as amostras brasileiras (2, 3, 4, 5,

6, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 21, 22, 25R e 39) e amostras Áustria 2, Hungria e China 1, a amostra Reino Unido não foi incluída pois a ORF-2 não estava disponível no GenBank e (ii) PCV-2a compreende as amostras brasileiras (6, 13R, 22R, C e D) e a outras amostras de PCV-2 de outros países não citados no grupo anterior.

A relação entre as amostras 25R, 22R, 13R, C e D e entre as amostras 7, 6, 4 e 3 dos Estados de São Paulo e Santa Catarina, respectivamente, mostram que os dois “subtipos” de PCV-2 estão circulando nesses Estados.

6 CONCLUSÕES

1) Foram detectadas 20 amostras de PCV-2 num total de 870 amostras clínicas oriundas de diferentes Estados brasileiros durante o período de abril de 2001 a outubro de 2004.

2) Foram seqüenciadas as regiões codificadoras ORF-1 e 2 de 10 amostras, a ORF-1 de uma amostra e a ORF-2 de nove amostras.

3) Foi demonstrada através análise filogenealógica das regiões ORF-1 e 2 a presença de dois subtipos de PCV-2, o PCV-2a e PCV-2b.

REFERÊNCIAS¹

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some Biological and Physico-Chemical properties of Porcine Circovirus. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 41, n. 1, p. 17-26, 1994.

ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; CASSIDY, J. P.; REILLY, G. A. C.; ADAIR, B. M.; ELLIS, W. A.; MCNULTY M. S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 49-64, 1995.

ALLAN, G. M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J. C.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S. J.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Experimental Reproduction of Severe Wasting Disease by Co-infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p. 1-11, 1999.

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

ALLAN, G. M.; MCNEILLY, E.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; MOFFETT, D.; MALONE, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. **Veterinary Record**, v. 10, p. 711-712, 2000.

ANUALPEC: Anuário da pecuária brasileira São Paulo: Finep Consultoria e Comercio, 2002. p. 281-332.

BASSAMI, M. R.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to *Porcine circovirus*, plant circoviruses and chicken anaemia virus. **Virology**, v. 249, n. 2, p. 453-459, 1998.

BERSANO, J. G.; CASTRO, A. M. M. G.; BRANDÃO, P. E.; VILLALOBOS, E. M. C.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; RUIZ, V. L. A.; LEOMIL, H.; CATROXO, M. H. B.; MONTEIRO, R. M.; OGATA, R. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detecção de infecção mista por circovírus suíno (PCV) e coronavírus em suíno: relato de caso. **In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 16. e CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIA, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 1., 2003, São Paulo. Anais...**

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003.84 p.

BLANCHARD, P.; MAHÉ, D.; CARIOLET, R.; TRUONG, C.; LE DIMNA, M.; ARNAULD, C.; ROSE, N.; EVENO, E.; ALBINA, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. An ORF-2protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 183-194, 2003.

BOGDAN, J.; WEST, K.; CLARK, E.; KONOBY, C.; HAINES, D.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995–1998. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 548–550, 2001.

BONEVA, R. S.; FOLKS, T. M.; CHAPMAN, L. E. Infectious disease issues in xenotransplantation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.1, p. 1-14, 2001.

CASTRO, A. M. M. G.; CORTEZ, A.; RUIZ, V. L. A.; LEOMIL, H.; MORENO, A. M.; DOTO, D. S.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. **Veterinary Record**, v. 154, p. 728-729, 2004.

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

CHEUNG, A. K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and dna replication of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 313, n. 2, p. 452-459, 2003.

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. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 302–305, 2000.

CHOI, J.; STEVENSON, G. W.; KIUPEL, M.; HARRACH, B.; ANOTHAYANONTHA, L.; KANITZ, C. L.; MITTAL, S. K. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.66, p. 217-224, 2002.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização de circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001. **Anais...**

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

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, n. 12, p. 6297-6303, 2004.

GIRARD, C.; MORIN, M.; EIAZHARY, Y. Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with an influenza A virus. **Veterinary Record**, v. 130, p. 206-207, 1992.

GRESHAM, A.; JACKSON, G.; GILES, N.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 29, p. 143, 2000.

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

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

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.; GRUDESKEI, E.; NAYAR, G. P. S. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 44-52, 2000.

HARDING, J. C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. **Swine Health Prod.**, v. 6, p. 249-254, 1996.

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

HARDING; J.; CLARK E. (Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, v. 5, p. 201–203, 1998.

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

HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; BOLIN, S. R.; LAGER, K. M.; MOROZOV, I.; PAUL, P. S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs

concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 528–539, 2001.

HÉLIE, P.; DROLET, R.; GERMAIN, M. C.; BOURGAULT, A. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 150–154, 1995.

HUESELSSENBECK, J. P.; RANNALA, B. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in evolutionary context. **Science**, v. 276, p. 227–232, 1997.

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

KATO, A.; FUJINO, M.; NAKAMURA, T.; ISHIHAMA, A.; OTAKI, Y. Gene organization of chicken anemia virus. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 480–488, 1995.

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

KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA, W.; TANTILEARTCHAROEN, R.; KATAYAMA, K.; SUZUKI, K.; LEKDUMROGSAK, T.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Psittacine beak and feather disease in three captive sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*) in Thailand. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 64, n.6, p. 527–529, 2002.

KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 105–111, 2001.

KIM, J.; CHOI, C.; HAN, D. U.; CHAE, C. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. **Veterinary Record**, v. 149, n. 8, p. 304–305, 2001.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0. Pennsylvania State University and Arizona State University, Tempe, 2000.

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

LAROCHELLE, R.; SAUVAGEAU, R.; MAGAR, R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 513–515, 1994.

LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M.; MAGAR, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 80, p. 69-75, 1999.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 114-120, 2003.

LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L. A. Quantitative, Competitive PCR Analysis of Porcine Circovirus DNA in Serum from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3474-3477, 2000.

LYOO, K. S.; PARK, Y. H.; PARK, B. K. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. **Journal Veterinary Science**, v. 2, n. 3, p. 201-207, 2001.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, 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.

MAGAR, R.; MULLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to PCV type 1 and type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 184-186, 2000.

MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G.; BUHK, H. J. Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2562-2566, 1997.

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

MANKERTZ, A.; ÇALISKAN, R.; KIM, A.; BERND, H.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; SCHMITT, C.; STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T. Molecular biology of *Porcine circovirus*: analyses of gene expression and viral replication **Veterinary**

Microbiology, v. 98, p. 81–88, 2004.

MEEHAN, B.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V. A.; ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M.; ALLAN, G. M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2171-2179, 1998.

MICHAELS, M. G.; SIMMONS, R. L. Xenotransplant-associated zoonoses. Strategies for prevention. **Transplantation**, v. 57, p. 1-7, 1994.

MORENO, A. M.; CASTRO, A. M. M. G. DE; PAIXÃO, R.; CORTEZ, A.; DOTO, D. S.; LEOMIL, H.; BACCARO, M. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Associação entre circovírus suíno tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia/GO. **Anais...**

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

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. J.; PAUL, P. S. Detection of a Novel Strain of Porcine Circovirus in Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2535-2541, 1998.

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

NIAGRO, F. D.; FORSTHOEFEL, A. N.; LAWTHOR, R. P.; KAMALANATHAN, L.; RITCHIE, B. W.; LATIMER, K. S.; LUKERT, P. D. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Archives of Virology**, v. 143, n.9, p. 1723-1744, 1998.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUND, M.; CLARK, E. G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J. A. Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 551-553, 2001.

OUARDANI, M.; WILSON, L.; JETTÉ, R.; MONTPETIT, C.; DEA, S. Multiplex PCR for detection and Typing of Porcine Circoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3917-3924, 1999.

PALLARES, F. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S. D.; VILLAR, D.; JANKE, B. H.; YAEGER, M. J.; LARSON, D. J.; SCHWARTZ, K. J.; YOON, K. J.; HOMAN, L. J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US .eld cases of

postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 515–519, 2002.

PESCH, S.; SCHMIDT, U.; OHLINGER, V. F.; Proliferative necrotising pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV-2). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PIGS VETERINARY SOCIETY, 16., 2000. **Proceedings...** p. 581.

POSADAS, J.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817–818, 1988.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J. M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, v. 149, p. 357–361, 2001.

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

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

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

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

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

SARRADELL, J.; PEREZ, A.M.; ANDRADA, M.; RODRIGUEZ, F.; FERNANDEZ, A.; SEGALÉS, J. PMWS in Argentina. **Veterinary Record**, v. 150, p. 323, 2002.

SATO, K.; SHIBAHARA, T.; ISHIKAWA, Y.; KONDO, H.; KUBO, M.; KADOTA, K. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62, n. 6, p. 627–633, 2000.

SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; ESPUÑA, E.;

- DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **Veterinary Record**, v. 142, p. 483–486, 1998.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109-124, 2002.
- SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 137–149, 2004.
- SHIBATA, I.; OKUDA, 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, nasal swab and feces from experimentally infected pigs and field cases. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 65, n. 3, p. 405-408, 2003.
- SMITH, W. J.; THOMSON, J. R.; DONE, S. Dermatitis/ nephropathy syndrome of pigs. **Veterinary Record**, v. 132, p. 47, 1993.
- STEVENSON, G. W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S. K.; CHOI, J.; LATIMER, K. S.; KANITZ, L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 13, p. 57–62, 2001.
- STUDDERT, M. J. *Circoviridae*: new viruses of pigs, parrots and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 4, p. 121-122, 1993.
- SWOFFORD, D. L. Paup. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M. C.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 108–116, 1998.
- THOMPSON, J.; SMITH, B.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MCVICAR, C. PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland. **Veterinary Record**, v. 146, p. 651–652, 2000a.
- THOMSON, J. R.; WILLIAMS, R. A.; DICK, J. D.; SUMPTION, K. Current and future PCR diagnostic technology for pig diseases. **The Pig Journal**, v. 46, p. 142-149, 2000b.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirua and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbe Bakteriolog A**, v. 226, p. 153-167, 1974.
- TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, p. 64-66, 1982.

- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on Epidemiology and Pathogenicity of Porcine Circovirus. **Archives of Virology**, v. 91, p. 271-276, 1986.
- TODD, D.; WESTON, J. H.; SOIKE, D.; SMYTH, J. A. Genome sequence determinatiuons and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 354-362, 2001.
- TUCKER, A. W.; MCNEILL, Y. F.; MEEHAN, B.; GALBRAITH, D.; MCARDLE, P. D.; ALLAN, G.; PATIENCE, C. Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs. **Xenotransplantation**, v. 10, n. 4, p. 343-348, 2003.
- WANG, C.; HUANG, T.; HUANG, C.; TU, C.; JONG, M.; LIN, S. Y.; LAI, S. Characterization of Porcine Circovirus Type 2 in Taiwan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 5, p. 469-475, 2004.
- WELLENBERG, G. J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F. W.; STEVERINK, P. J. G. M.; HUNNEMAN, W.; VORST, T. J. K.; VAN DER PEPEKAMP, N. H. M. T.; OHLINGER, V. F.; SCHIPPERS, R.; VAN OIRSCHOT, J. T.; DE 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.
- WEST, K. W.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation** , v.11, n. 6, p. 530–532, 1999.

Seq	am16	am22	am4	am3	am9	am7	am2	am21	china1	HU	Aut2	UK	Can1	Can2	Can3	USA	AS	Aut1	china2	Jap	Tai	PCV-1
am16	-	1,00	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,998	0,995	0,958	0,957	0,951	0,956	0,958	0,956	0,955	0,957	0,958	0,759
am22	1,00	-	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,998	0,995	0,958	0,957	0,951	0,956	0,958	0,956	0,955	0,957	0,958	0,759
am4	0,997	0,997	-	0,998	0,997	0,998	0,998	0,997	0,992	0,994	0,995	0,992	0,955	0,954	0,949	0,953	0,955	0,953	0,952	0,954	0,955	0,758
am3	0,997	0,997	0,998	-	0,997	1,00	1,00	0,998	0,994	0,995	0,997	0,994	0,956	0,955	0,95	0,954	0,956	0,953	0,953	0,955	0,956	0,758
am9	1,00	1,00	0,997	0,997	-	0,997	0,997	0,997	0,995	0,997	0,998	0,995	0,958	0,957	0,951	0,956	0,958	0,956	0,955	0,957	0,958	0,759
am7	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	-	1,00	0,998	0,994	0,995	0,997	0,994	0,956	0,955	0,95	0,954	0,956	0,953	0,953	0,955	0,956	0,758
am2	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	1,00	-	0,998	0,994	0,995	0,997	0,994	0,956	0,955	0,95	0,954	0,956	0,953	0,953	0,955	0,956	0,758
am21	0,997	0,997	0,997	0,998	0,997	0,998	0,998	-	0,992	0,994	0,995	0,992	0,955	0,954	0,949	0,953	0,955	0,953	0,952	0,954	0,956	0,757
china1	0,995	0,995	0,992	0,994	0,995	0,994	0,994	0,992	-	0,993	0,995	0,992	0,955	0,954	0,949	0,953	0,955	0,951	0,952	0,954	0,956	0,756
HU	0,997	0,997	0,994	0,995	0,997	0,995	0,995	0,994	0,993	-	0,997	0,994	0,956	0,955	0,95	0,954	0,956	0,953	0,953	0,955	0,956	0,758
Aut2	0,998	0,998	0,995	0,997	0,998	0,997	0,997	0,995	0,995	0,997	-	0,997	0,958	0,957	0,951	0,956	0,958	0,954	0,955	0,957	0,958	0,759
UK	0,995	0,995	0,992	0,994	0,995	0,994	0,994	0,992	0,992	0,994	0,997	-	0,956	0,955	0,95	0,954	0,956	0,953	0,954	0,955	0,956	0,759
Can1	0,958	0,958	0,955	0,956	0,958	0,956	0,956	0,955	0,955	0,956	0,958	0,956	-	0,992	0,985	0,994	0,992	0,974	0,983	0,995	0,976	0,755
Can2	0,957	0,957	0,954	0,955	0,957	0,955	0,955	0,954	0,954	0,955	0,957	0,955	0,992	-	0,985	0,988	0,995	0,971	0,978	0,991	0,972	0,754
Can3	0,951	0,951	0,949	0,95	0,951	0,95	0,95	0,949	0,949	0,95	0,951	0,95	0,985	0,985	-	0,983	0,987	0,964	0,972	0,984	0,968	0,749
USA	0,956	0,956	0,953	0,954	0,956	0,954	0,954	0,953	0,953	0,954	0,956	0,954	0,994	0,988	0,983	-	0,99	0,972	0,98	0,992	0,974	0,755
AS	0,958	0,958	0,955	0,956	0,958	0,956	0,956	0,955	0,955	0,956	0,958	0,956	0,992	0,995	0,987	0,99	-	0,972	0,98	0,992	0,973	0,754
Aut1	0,956	0,956	0,953	0,953	0,956	0,953	0,953	0,953	0,951	0,953	0,954	0,953	0,974	0,971	0,964	0,972	0,972	-	0,979	0,974	0,967	0,751
china2	0,955	0,955	0,952	0,953	0,955	0,953	0,953	0,952	0,952	0,953	0,955	0,954	0,983	0,978	0,972	0,98	0,98	0,979	-	0,984	0,974	0,754
Jap	0,957	0,957	0,954	0,955	0,957	0,955	0,955	0,954	0,954	0,955	0,957	0,955	0,995	0,991	0,984	0,992	0,992	0,974	0,984	-	0,975	0,755
Tai	0,958	0,958	0,955	0,956	0,958	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,958	0,956	0,976	0,972	0,968	0,974	0,973	0,967	0,974	0,975	-	0,754
PCV-1	0,759	0,759	0,758	0,758	0,759	0,758	0,758	0,757	0,756	0,758	0,759	0,759	0,755	0,754	0,749	0,755	0,754	0,751	0,754	0,755	0,754	-

Apêndice B - Grau de identidade para sequência completas das oito amostras de PCV-2 brasileiras, 14 amostras de PCV-2 de diferentes países e PCV-1

Motivo 1				Motivo 2				Motivo 3				Sitio de ligação dNTP			
60	70	80	90	170	180	190	300	310	530	540	640	650	660		
am16	TGTTCACTCTGAATAATCCCTCCAGACGA			am16	ACACCTCACCTCCAGGGTTC		am16	GAATACTCAGTAAG		am16	CCACTGGGTGGTA				
am4	V F T L N N P S E D			am4	T P H L Q G F			E Y C S K		am4	G C G K S				
am3	V F T L N N P S E D			am3	T P H L Q G F			E Y C S K		am3	G C G K S				
am21	V F T L N N P S E D			am21	T P H L Q G F			E Y C S K		am21	G C G K S				
CAN1	V F T L N N P S E D			CAN1	T P H L Q G F			E Y C S K		CAN1	G C G K S				
CAN2	V F T L N N P S E D			CAN2	T P H L Q G F			E Y C S K		CAN2	G C G K S				
CAN3	V F T L N N P S E D			CAN3	T P H L Q G F			E Y C S K		CAN3	G C G K S				
USA	V F T L N N P S E D			USA	T P H L Q G F			E Y C S K		USA	G C G K S				
UK	V F T L N N P S E D			UK	T P H L Q G F			E Y C S K		UK	G C G K S				
HU	V F T L N N P S E D			HU	T P H L Q G F			E Y C S K		HU	G C G K S				
AS	V F T L N N P S E D			AS	T P H L Q G F			E Y C S K		AS	G C G K S				
AUT1	V F T L N N P S E D			AUT1	T P H L Q G F			E Y C S K		AUT1	G C G K S				
AUT2	V F T L N N P S E D			AUT2	T P H L Q G F			E Y C S K		AUT2	G C G K S				
CHINA1	V F T L N N P S E D			CHINA1	T P H L Q G F			E Y C S K		CHINA1	G C G K S				
CHINA2	V F T L N N P S E D			CHINA2	T P H L Q G F			E Y C S K		CHINA2	G C G K S				
JA	V F T L N N P S E D			JA	T P H L Q G F			E Y C S K		JA	G C G K S				
TAI	V F T L N N P S E D			TAI	T P H L Q G F			E Y C S K		TAI	G C G K S				

Legenda: Canadá 1, 2 e 3 (CAN 1, 2 e 3); Estados Unidos (USA); Reino Unido (UK); Hungria (HU); África do Sul (AS); Austrália 1 e 2 (AUT 1 e 2); Japão (JA) e Taiwan (TAI)

Apêndice C – Alinhamento das regiões *motif* 1, 2 e 3 e das duas regiões de sítio de ligação dNTP (A e B) das amostras de PCV-2 brasileiras e de outros países. Os pontos indicam resíduos idênticos

<i>Motif 1</i>	<i>Motif 2</i>	<i>Motif 3</i>
<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>
<p>..... -TTCACTCTGAATAATCCTT F T L N N P C.....T....C..C..CA F T L N N P T.....T..C..C...A F T L N N P</p>	<p>..... CACCTCACCTCCAGGGGTTTCG T P H L Q G F .C..G..T..G..A..T..T. T P H L Q G F .T..C..TT.G..A..C.A.T T P H L Q G Y</p>	<p>..... AATACTGCAGT E Y C S .G.....TC. K Y C S .G..T..... K Y C S</p>
Sítio de ligação dNTP A		
<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>
<p>..... CACCTGGGTGTGGTAAAGCAAATGGGCTGC P P G C G K S K W A A .G..C..T..C..G..G...CGT.....A.. P P G C G K S R W A AG.....C..G..TCG.....CAA P P G C G K S R W A N</p>	<p>..... TGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTAT E E V V V I D D F Y CC.G.....A..CA.C.....C..C Q E V V I I D D F Y T....T..C..CA.CT.G..C..... E D V V I L D D F Y</p>	<p>..... AATACTGCAGT E Y C S .G.....TC. K Y C S .G..T..... K Y C S</p>
Sítio de ligação dNTP B		
<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>	<p>amostra 16 CoCV (NC00236) BFDV (AF071878)</p>
<p>..... CACCTGGGTGTGGTAAAGCAAATGGGCTGC P P G C G K S K W A A .G..C..T..C..G..G...CGT.....A.. P P G C G K S R W A AG.....C..G..TCG.....CAA P P G C G K S R W A N</p>	<p>..... TGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTAT E E V V V I D D F Y CC.G.....A..CA.C.....C..C Q E V V I I D D F Y T....T..C..CA.CT.G..C..... E D V V I L D D F Y</p>	<p>..... AATACTGCAGT E Y C S .G.....TC. K Y C S .G..T..... K Y C S</p>

Apêndice D – Alinhamento das regiões *motif 1*, 2 e 3 e das duas regiões de sítio de ligação dNTP (A e B) da amostra de PCV-2 brasileira (amostra 16), circovírus de colúmbidos (CoCV – NC002361) e vírus da doença dos bicos e penas (BFDV – AF0718781) - as regiões estão em negrito e sublinhadas. Os pontos indicam resíduos idênticos

am5orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am15orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am23orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am16orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am2orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am9orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am21orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am4orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am7orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am22orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am3orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am5orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am15orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am23orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am16orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am2orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am9orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am21orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am4orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am7orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am22orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
am3orf1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160

(Continua)

[illegible]

(Conclusão)

Apêndice E - Sequências nucleotídicas da ORF-1 de 11 das amostras brasileiras de PCV-2-positivas. Os pontos indicam resíduos idênticos

Seq	am5	am15	am23	am16	am2	am9	am21	am4	am7	am22	am3	china1	HU	Aut2	UK	Can1	Can2	USA	AS	Aut1	china2	Jap	Tai	PCV-1
am5	-	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	1,00	0,995	0,994	0,996	0,995	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,827
am15	0,997	-	0,995	0,995	0,997	0,995	0,995	0,996	0,997	0,995	0,997	0,993	0,992	0,994	0,993	0,976	0,965	0,977	0,976	0,975	0,974	0,975	0,974	0,828
am23	0,997	0,995	-	1,00	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,996	0,998	0,997	0,98	0,969	0,982	0,98	0,979	0,978	0,979	0,978	0,829
am16	0,997	0,995	1,00	-	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,996	0,998	0,997	0,98	0,969	0,982	0,98	0,979	0,978	0,979	0,978	0,829
am2	1,00	0,997	0,997	0,997	-	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	1,00	0,995	0,994	0,996	0,995	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,827
am9	0,997	0,995	1,00	1,00	0,997	-	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,996	0,998	0,997	0,98	0,969	0,982	0,98	0,979	0,978	0,979	0,978	0,829
am21	0,997	0,995	0,995	0,995	0,997	0,995	-	0,996	0,997	0,995	0,997	0,993	0,992	0,994	0,993	0,976	0,965	0,977	0,976	0,975	0,974	0,975	0,975	0,824
am4	0,998	0,996	0,996	0,996	0,998	0,996	0,996	-	0,998	0,996	0,998	0,994	0,993	0,995	0,994	0,977	0,966	0,978	0,977	0,976	0,975	0,976	0,975	0,825
am7	1,00	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	-	0,997	1,00	0,995	0,994	0,996	0,995	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,827
am22	0,997	0,995	1,00	1,00	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	-	0,997	0,997	0,996	0,998	0,997	0,98	0,969	0,982	0,98	0,979	0,978	0,979	0,978	0,829
am3	1,00	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	-	0,995	0,994	0,996	0,995	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,827
china1	0,995	0,993	0,997	0,997	0,995	0,997	0,993	0,994	0,995	0,997	0,995	-	0,994	0,996	0,995	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,827
HU	0,994	0,992	0,996	0,996	0,994	0,996	0,992	0,993	0,994	0,996	0,994	0,994	-	0,995	0,994	0,978	0,967	0,979	0,978	0,977	0,976	0,977	0,976	0,828
Aut2	0,996	0,994	0,998	0,998	0,996	0,998	0,994	0,995	0,996	0,998	0,996	0,996	0,995	-	0,998	0,98	0,969	0,982	0,98	0,978	0,978	0,979	0,979	0,83
UK	0,995	0,993	0,997	0,997	0,995	0,997	0,993	0,994	0,995	0,997	0,995	0,995	0,994	0,998	-	0,979	0,968	0,98	0,979	0,977	0,977	0,978	0,978	0,83
Can1	0,978	0,976	0,98	0,98	0,978	0,98	0,976	0,977	0,978	0,98	0,978	0,978	0,978	0,98	0,979	-	0,986	0,997	0,997	0,984	0,989	0,996	0,984	0,825
Can2	0,967	0,965	0,969	0,969	0,967	0,969	0,965	0,966	0,967	0,969	0,967	0,967	0,967	0,969	0,968	0,986	-	0,986	0,986	0,972	0,977	0,985	0,972	0,815
USA	0,979	0,977	0,982	0,982	0,979	0,982	0,977	0,978	0,979	0,982	0,979	0,979	0,979	0,982	0,98	0,997	0,986	-	0,997	0,985	0,989	0,996	0,985	0,827
AS	0,978	0,976	0,98	0,98	0,978	0,98	0,976	0,977	0,978	0,98	0,978	0,978	0,978	0,98	0,979	0,997	0,986	0,997	-	0,984	0,989	0,996	0,984	0,825
Aut1	0,977	0,975	0,979	0,979	0,977	0,979	0,975	0,976	0,977	0,979	0,977	0,977	0,977	0,978	0,977	0,984	0,972	0,985	0,984	-	0,982	0,984	0,98	0,822
china2	0,976	0,974	0,978	0,978	0,976	0,978	0,974	0,975	0,976	0,978	0,976	0,976	0,976	0,978	0,977	0,989	0,977	0,989	0,989	0,982	-	0,99	0,984	0,825
Jap	0,977	0,975	0,979	0,979	0,977	0,979	0,975	0,976	0,977	0,979	0,977	0,977	0,977	0,979	0,978	0,996	0,985	0,996	0,996	0,984	0,99	-	0,983	0,828
Tai	0,976	0,974	0,978	0,978	0,976	0,978	0,975	0,975	0,976	0,978	0,976	0,976	0,976	0,979	0,978	0,984	0,972	0,985	0,984	0,98	0,984	0,983	-	0,828
PCV-1	0,827	0,828	0,829	0,829	0,827	0,829	0,824	0,825	0,827	0,829	0,827	0,827	0,828	0,83	0,83	0,825	0,815	0,827	0,825	0,822	0,825	0,828	0,828	-

Apêndice F - Grau de identidade para sequência da ORF-1 de 11 oito amostras de PCV-2 brasileiras, 12 amostras de PCV-2 de diferentes países e PCV-1

Seq	am5	am15	am23	am16	am2	am9	am21	am4	am7	am22	am3	PDNS	PMWS	aborto1	CT	aborto2
am5	-	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	1,00	0,995	0,979	0,978	0,978	0,979
am15	0,997	-	0,995	0,995	0,997	0,995	0,995	0,996	0,997	0,995	0,997	0,993	0,977	0,976	0,976	0,977
am23	0,997	0,995	-	1,00	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,982	0,98	0,98	0,982
am16	0,997	0,995	1,00	-	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,982	0,98	0,98	0,982
am2	1,00	0,997	0,997	0,997	-	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	1,00	0,995	0,979	0,978	0,978	0,979
am9	0,997	0,995	1,00	1,00	0,997	-	0,995	0,996	0,997	1,00	0,997	0,997	0,982	0,98	0,98	0,982
am21	0,997	0,995	0,995	0,995	0,997	0,995	-	0,996	0,997	0,995	0,997	0,993	0,977	0,976	0,976	0,977
am4	0,998	0,996	0,996	0,996	0,998	0,996	0,996	-	0,998	0,996	0,998	0,994	0,978	0,977	0,977	0,978
am7	1,00	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	-	0,997	1,00	0,995	0,979	0,978	0,978	0,979
am22	0,997	0,995	1,00	1,00	0,997	1,00	0,995	0,996	0,997	-	0,997	0,997	0,982	0,98	0,98	0,982
am3	1,00	0,997	0,997	0,997	1,00	0,997	0,997	0,998	1,00	0,997	-	0,995	0,979	0,978	0,978	0,979
PDNS	0,995	0,993	0,997	0,997	0,995	0,997	0,993	0,994	0,995	0,997	0,995	-	0,98	0,979	0,979	0,98
PMWS	0,979	0,977	0,982	0,982	0,979	0,982	0,977	0,978	0,979	0,982	0,979	0,98	-	0,998	0,998	1,00
aborto1	0,978	0,976	0,98	0,98	0,978	0,98	0,976	0,977	0,978	0,98	0,978	0,979	0,998	-	0,997	0,998
CT	0,978	0,976	0,98	0,98	0,978	0,98	0,976	0,977	0,978	0,98	0,978	0,979	0,998	0,997	-	0,998
aborto2	0,979	0,977	0,982	0,982	0,979	0,982	0,977	0,978	0,979	0,982	0,979	0,98	1,00	0,998	0,998	-

Apêndice G - Grau de identidade para sequência da ORF-1 de 11 amostras de PCV-2 brasileiras e 5 amostras de PCV-2 associadas a diferentes sinais clínicos

[illegible]

(Continuação)

[illegible]

(Continuação)

Seq	am16	am2	am9	am21	am4	am7	am22	am3	am10	am15	am13	am39	am5	am6	amC	amD	am13R	am22R	am25R	Can1	Can2
am16	-	0,997	1,00	0,998	0,997	0,997	1,00	0,997	0,998	0,995	0,998	1,00	0,995	0,922	0,931	0,931	0,931	0,931	0,974	0,929	0,928
am2	0,997	-	0,997	0,998	0,997	1,00	0,997	1,00	0,998	0,998	0,998	0,997	0,998	0,919	0,928	0,928	0,928	0,928	0,971	0,928	0,926
am9	1,00	0,997	-	0,998	0,997	0,997	1,00	0,997	0,998	0,995	0,998	1,00	0,995	0,922	0,931	0,931	0,931	0,931	0,974	0,929	0,928
am21	0,998	0,998	0,998	-	0,998	0,998	0,998	0,998	0,997	0,997	0,997	0,998	0,997	0,921	0,929	0,929	0,929	0,929	0,972	0,928	0,926
am4	0,997	0,997	0,997	0,998	-	0,997	0,997	0,997	0,995	0,995	0,995	0,997	0,995	0,919	0,928	0,928	0,928	0,928	0,971	0,926	0,925
am7	0,997	1,00	0,997	0,998	0,997	-	0,997	1,00	0,998	0,998	0,998	0,997	0,998	0,919	0,928	0,928	0,928	0,928	0,971	0,928	0,926
am22	1,00	0,997	1,00	0,998	0,997	0,997	-	0,997	0,998	0,995	0,998	1,00	0,995	0,922	0,931	0,931	0,931	0,931	0,974	0,929	0,928
am3	0,997	1,00	0,997	0,998	0,997	1,00	0,997	-	0,998	0,998	0,998	0,997	0,998	0,921	0,928	0,928	0,928	0,928	0,971	0,928	0,926
am10	0,998	0,998	0,998	0,997	0,995	0,998	0,998	0,995	0,998	0,997	1,00	0,998	0,997	0,918	0,926	0,926	0,926	0,926	0,969	0,928	0,926
am15	0,995	0,998	0,995	0,997	0,995	0,998	0,998	0,995	0,998	0,997	-	0,997	0,995	0,921	0,929	0,929	0,929	0,929	0,972	0,929	0,928
am13	0,998	0,998	0,998	0,997	0,995	0,998	0,998	0,998	1,00	0,997	-	0,998	0,997	0,921	0,929	0,929	0,929	0,929	0,972	0,929	0,928
am39	1,00	0,997	1,00	0,998	0,997	0,997	1,00	0,997	0,998	0,995	0,998	-	0,995	0,922	0,931	0,931	0,931	0,931	0,974	0,929	0,928
am5	0,995	0,998	0,995	0,997	0,995	0,998	0,995	0,998	0,997	0,997	0,997	0,995	-	0,918	0,926	0,926	0,926	0,926	0,969	0,926	0,925
am6	0,922	0,919	0,922	0,921	0,919	0,919	0,922	0,919	0,921	0,918	0,921	0,922	0,918	-	0,971	0,971	0,971	0,971	0,944	0,959	0,951
amC	0,931	0,928	0,931	0,929	0,928	0,928	0,931	0,928	0,929	0,926	0,929	0,931	0,926	0,971	-	1,00	1,00	1,00	0,957	0,957	0,954
amD	0,931	0,928	0,931	0,929	0,928	0,928	0,931	0,928	0,929	0,926	0,929	0,931	0,926	0,971	1,00	-	1,00	1,00	0,957	0,957	0,954
am13R	0,931	0,928	0,931	0,929	0,928	0,928	0,931	0,928	0,929	0,926	0,929	0,931	0,926	0,971	1,00	1,00	-	1,00	0,957	0,957	0,954
am22R	0,931	0,928	0,931	0,929	0,928	0,928	0,931	0,928	0,929	0,926	0,929	0,931	0,926	0,971	1,00	1,00	1,00	-	0,957	0,957	0,954
am25R	0,974	0,971	0,974	0,972	0,971	0,971	0,974	0,971	0,972	0,969	0,972	0,974	0,969	0,944	0,957	0,957	0,957	0,957	-	0,946	0,948
Can1	0,929	0,928	0,929	0,928	0,926	0,928	0,929	0,928	0,929	0,928	0,929	0,929	0,926	0,959	0,957	0,957	0,957	0,957	0,946	-	0,985
Can2	0,928	0,926	0,928	0,926	0,925	0,926	0,928	0,926	0,928	0,926	0,928	0,928	0,925	0,951	0,954	0,954	0,954	0,954	0,948	0,985	-
USA	0,922	0,921	0,922	0,921	0,919	0,921	0,922	0,921	0,922	0,921	0,922	0,922	0,919	0,952	0,949	0,949	0,949	0,949	0,939	0,989	0,978
HU	0,997	0,997	0,997	0,995	0,994	0,997	0,997	0,997	0,998	0,995	0,998	0,997	0,995	0,919	0,928	0,928	0,928	0,928	0,971	0,928	0,926
AS	0,928	0,926	0,928	0,926	0,925	0,926	0,928	0,926	0,928	0,926	0,928	0,928	0,925	0,954	0,951	0,951	0,951	0,951	0,945	0,985	0,988
Aut1	0,924	0,921	0,924	0,922	0,921	0,921	0,924	0,921	0,922	0,919	0,922	0,924	0,919	0,989	0,964	0,964	0,964	0,964	0,944	0,961	0,952
Aut2	0,998	0,998	0,998	0,997	0,995	0,998	0,998	0,998	1,00	0,997	1,00	0,998	0,997	0,921	0,929	0,929	0,929	0,929	0,972	0,929	0,928
china1	0,992	0,992	0,992	0,991	0,989	0,992	0,992	0,992	0,994	0,991	0,994	0,992	0,991	0,915	0,924	0,924	0,924	0,924	0,967	0,925	0,924
china2	0,924	0,922	0,924	0,922	0,921	0,922	0,924	0,922	0,924	0,922	0,924	0,924	0,921	0,979	0,965	0,965	0,965	0,965	0,938	0,974	0,962
Jap	0,926	0,925	0,926	0,925	0,924	0,925	0,926	0,925	0,926	0,925	0,926	0,926	0,924	0,959	0,954	0,954	0,954	0,954	0,944	0,994	0,982
PCV-1	0,672	0,673	0,672	0,673	0,675	0,673	0,672	0,673	0,672	0,672	0,672	0,672	0,672	0,659	0,666	0,666	0,666	0,666	0,67	0,666	0,666

(Continua)

Seq	USA	HU	AS	Aut1	Aut2	china1	china2	Jap	PCV-1
am16	0,922	0,997	0,928	0,924	0,998	0,992	0,924	0,926	0,672
am2	0,921	0,997	0,926	0,921	0,998	0,992	0,922	0,925	0,673
am9	0,922	0,997	0,928	0,924	0,998	0,992	0,924	0,926	0,672
am21	0,921	0,995	0,926	0,922	0,997	0,991	0,922	0,925	0,673
am4	0,919	0,994	0,925	0,921	0,995	0,989	0,921	0,924	0,675
am7	0,921	0,997	0,926	0,921	0,998	0,992	0,922	0,925	0,673
am22	0,922	0,997	0,928	0,924	0,998	0,992	0,924	0,926	0,672
am3	0,921	0,997	0,926	0,921	0,998	0,992	0,922	0,925	0,673
am10	0,922	0,998	0,928	0,922	1,00	0,994	0,924	0,926	0,672
am15	0,921	0,995	0,926	0,919	0,997	0,991	0,922	0,925	0,672
am13	0,922	0,998	0,928	0,922	1,00	0,994	0,924	0,926	0,672
am39	0,922	0,997	0,928	0,924	0,998	0,992	0,924	0,926	0,672
am5	0,919	0,995	0,925	0,919	0,997	0,991	0,921	0,924	0,672
am6	0,952	0,919	0,954	0,989	0,921	0,915	0,979	0,959	0,659
amC	0,949	0,928	0,951	0,964	0,929	0,924	0,965	0,954	0,666
amD	0,949	0,928	0,951	0,964	0,929	0,924	0,965	0,954	0,666
am13R	0,949	0,928	0,951	0,964	0,929	0,924	0,965	0,954	0,666
am22R	0,949	0,928	0,951	0,964	0,929	0,924	0,965	0,954	0,666
am25R	0,939	0,971	0,945	0,944	0,972	0,967	0,938	0,944	0,67
Can1	0,989	0,928	0,985	0,961	0,929	0,925	0,974	0,994	0,666
Can2	0,978	0,926	0,988	0,952	0,928	0,924	0,962	0,982	0,666
USA	-	0,921	0,978	0,954	0,922	0,918	0,967	0,987	0,666
HU	0,921	-	0,926	0,921	0,998	0,992	0,922	0,925	0,672
AS	0,978	0,926	-	0,955	0,928	0,924	0,965	0,985	0,663
Aut1	0,954	0,921	0,955	-	0,922	0,916	0,975	0,961	0,66
Aut2	0,922	0,998	0,928	0,922	-	0,994	0,924	0,926	0,672
china1	0,918	0,992	0,924	0,916	0,994	-	0,919	0,922	0,67
china2	0,967	0,922	0,965	0,975	0,924	0,919	-	0,974	0,665
Jap	0,987	0,925	0,985	0,961	0,926	0,922	0,974	-	0,665
PCV-1	0,666	0,672	0,663	0,66	0,672	0,67	0,665	0,665	-

(Conclusão)

Apêndice I - Grau de identidade para sequência ORF-2 de 19 amostras de PCV-2 brasileiras e 10 amostras de PCV-2 de diferentes países e PCV-1