

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AMPLIFICAÇÃO DO GENOMA DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2)  
POR CÍRCULO ROLANTE E PRODUÇÃO DE UM CLONE VIRAL**

Diogenes Dezen

Porto Alegre  
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AMPLIFICAÇÃO DO GENOMA DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2)  
POR CÍRCULO ROLANTE E PRODUÇÃO DE UM CLONE VIRAL**

Autor: Diogenes Dezen

Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias, na área de  
Medicina Veterinária Preventiva –  
Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel  
Roche

Porto Alegre  
2007

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo M. Roehle, por ter depositado um voto de confiança e permitir a realização dos experimentos, agregando valor ao trabalho com valiosas sugestões.

Ao Dr. Fransciscus Rijsewijk (Laboratório de Virologia, ICBS – UFRGS), pelo coleguismo e auxílio laboratorial prestado, estando sempre disposto a colaborar e colocando sempre em dúvidas os resultados, levando deste modo à reflexões importantes do assunto.

A Prof. Dra. Ana Cláudia Franco (Laboratório de Virologia, ICBS – UFRGS), pelo exemplo profissional e por coordenar o laboratório de modo a contribuir no andamento dos projetos.

Ao Prof. Dr. David Driemeier (Setor de Patologia, FAVET – UFRGS) e à Dra. Sandra Borowski (Laboratório de Patologia Suína – IPVDF), pelas amostras coletadas durante a necropsia dos suínos.

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin (Centro de Biotecnologia – UFPel), pelo auxílio no seqüenciamento das amostras.

Aos meus pais, que mesmo longe, sempre estiveram do meu lado, me protegendo e dando força para esta caminhada.

A minha noiva, Vivi, que foi o meu refúgio nas horas difíceis e me incentivou incansavelmente.

Aos amigos do laboratório de virologia do IPVDF e do ICBS, os que hoje aqui estão; Thais, Carine, Fabrício, Suzana, Samuel, Juliana e Dadá; e aqueles que foram, mas deixaram saudades; Anna Paula, Cíntia, Alessandra, Paulinho e Marco. Obrigado pelo companheirismo, pela troca de idéias, pelo apoio e pelos mates.

Ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de realização desta dissertação.

Enfim, a todos que depositaram seu voto de confiança em mim, meu muito obrigado, pois foi isto que me deu força para chegar até aqui.

**“Conhecimento real é saber a  
extensão da própria ignorância.”  
Confúcio**

## **AMPLIFICAÇÃO DO GENOMA DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) POR CÍRCULO ROLANTE E PRODUÇÃO DE UM CLONE VIRAL.**

### **RESUMO**

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é o principal agente envolvido na Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS). Na maioria dos países onde a suinocultura tem expressiva importância econômica, a SMDS vem causando sérios prejuízos. Com o objetivo de contribuir para a caracterização genética de isolados brasileiros de PCV2, duas amostras autóctones foram clonadas e seqüenciadas na íntegra. Para tanto, o genoma viral foi extraído de tecidos de animais com SMDS e amplificado pelo método denominado “amplificação em círculo rolante com múltiplos primers” (ACRMP). Ambas seqüências apresentaram 1.767 nucleotídeos e diferiram entre si em apenas um nucleotídeo. A análise filogenética destas duas seqüências mostrou maior identidade com o grupo (1A) formado por isolados holandeses, franceses e chineses. Um isolado brasileiro previamente seqüenciado, de Minas Gerais, foi classificado em outro grupo e a seqüência diferiu em até 16 nucleotídeos em relação aos isolados do Rio Grande do Sul. Na etapa seguinte desses estudos, visando o futuro desenvolvimento de vacinas, um dos genomas aqui seqüenciados foi transfectado em células de testículo de suíno (ST). Antígenos virais nas células transfectadas foram detectados por imunoperoxidase, demonstrando assim a infecciosidade do clone produzido. Entretanto, o clone infeccioso obtido não foi capaz de multiplicar-se a ponto de fornecer massa antigênica que viabilizasse a produção de uma vacina. Em vista disso, realizou-se uma tentativa de criar uma linhagem celular persistentemente infectada. Para isso, o DNA de PCV2 foi novamente transfectado em células ST com um plasmídeo contendo o gene de resistência a geneticin, visando a seleção de colônias celulares resistentes. Após a transfecção, porém, observou-se um efeito negativo na formação de colônias resistentes a esta droga. Este efeito foi dose-dependente em relação à quantidade de DNA de PCV2, o que impossibilitou o estabelecimento de uma linhagem celular persistentemente infectada. Isto pode estar relacionado com a expressão da proteína da ORF3 que induz apoptose ou à indução de citocinas, como interferons, embora outros mecanismos não possam ser excluídos, como efeito tóxico do alto número de cópias de genomas de PCV2. Analisando os resultados obtidos durante a realização destes estudos, conclui-se que as amostras de PCV2 circulantes no Brasil apresentam de identidade alta (99,09 %).

## **ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION OF GENOMES OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) AND VIRAL CLONE PRODUCTION.**

### **ABSTRACT**

Porcine circovirus type 2 is the main etiological agent implicated in the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. In countries with considerable swine production, PMWS is a major cause of economic losses. In order to perform a genetic analysis on Brazilian PCV2 isolates, two PCV2 isolates from the state of Rio Grande do Sul - Brazil, were cloned and fully sequenced. Viral genomes were extracted from tissues of animals with PMWS and amplified using multiply-primed rolling circle amplification (MPRCA). Both PCV2 sequences were 1,767 nucleotides long and differed in only one nucleotide from each other. Phylogenetic analysis of both sequences showed the highest sequence identity with a group of viruses (group 1A) that also harbors many Dutch, French and Chinese isolates. This suggests that the Brazilian PCV2 isolates examined here might have been imported from one of such countries. Interestingly, a Brazilian isolate from Minas Gerais previously sequenced by others, was observed to belong to another group of PCV2 isolates and differs at 16 different sites from the isolates from Rio Grande do Sul. In order to develop a vaccine, one of the isolates here sequenced was transfected into swine testis (ST) cells. Viral antigens were detected in the transfected ST cells by immunoperoxidase, indicating that such PCV2 clone could give rise to infectious virus. However, the cloned virus was not able to multiply to high titers, what would be a major drawback in vaccine development. In attempting to solve this problem, the development of a PCV2- persistently infected cell line was targeted. PCV2 DNA was cotransfected with a plasmid carrying the geneticin resistance gene in order to allow clone selection by identification of geneticin resistant cells. However, the PCV2 DNA had a negative effect on the number of geneticin resistant colonies. Interestingly, this negative effect of PCV2 DNA was dose dependent and for this reason, it was not possible to establishing a persistently infected cell line. This might be linked to ORF3 protein expression, which induces apoptosis or production of interferon. Analyzing the results obtained in this study, the Brazilian PCV2 isolates had high identity (99.05 %).

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Circovírus suíno .....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Organização genômica .....	10
1.1.1.1. Proteínas do <i>rep</i> .....	10
1.1.1.2. Proteína do <i>cap</i> .....	12
1.1.1.3. Proteína codificada pela ORF3 .....	12
1.1.2. Ciclo viral.....	13
1.1.2.1. Adsorção .....	13
1.1.2.2. Penetração .....	13
1.1.2.3. Replicação .....	14
1.1.3. Caracterização genética.....	15
<b>1.2. Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos.....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Histórico .....	15
1.2.2. Etiologia .....	16
1.2.3. Epidemiologia .....	16
1.2.4. Patogenia.....	17
1.2.5. Aspectos imunológicos .....	19
1.2.5.1. Perfil de expressão de citocinas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	19
1.2.5.2. Resposta mediada por anticorpos frente ao PCV2.....	21
1.2.5.3. Células associadas à imunidade inata e específica.....	22
1.2.6. Sinais clínicos .....	22
1.2.7. Lesões macro e microscópicas .....	23
1.2.8. Diagnóstico .....	24
1.2.9. Controle e prevenção .....	24
1.2.9.1. Práticas de manejo.....	24
1.2.9.2. Vacinas em desenvolvimento.....	25
1.2.10. Modelos experimentais da SMDS.....	26
1.2.10.1. Leitões gnotobióticos .....	27
1.2.10.2. Leitões privados da ingestão de colostro .....	27
1.2.10.3. Leitões amamentados com colostro .....	27
1.2.11. Considerações finais sobre a SMDS .....	28

<b>1.3. Outras manifestações clínicas associadas ao PCV2 .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. Síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos.....	28
1.3.2. Complexo das doenças respiratórias dos suínos .....	29
1.3.3. Falhas reprodutivas .....	30
1.3.4. Tremor congênito .....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. Objetivos Gerais.....	31
2.2. Objetivos Específicos .....	31
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>32</b>
3.1. Rolling circle amplification of genomes of Brazilian circovirus type 2 (PCV2) and propagation of recombinant PCV2 .....	32
<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>



## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Circovírus suíno

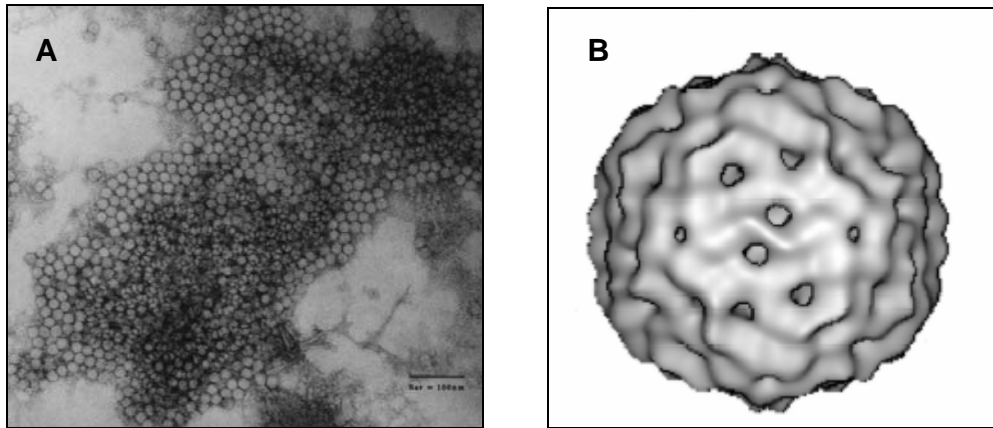
O circovírus suíno (PCV) é um vírus de genoma de DNA circular fita simples, não envelopado, de simetria icosaédrica que mede aproximadamente 17 nm (TISCHER et al. 1986), como representado na Figura 1. A densidade das partículas virais é de 1,36-1,37 g/ml em gradiente de CsCl, o vírus não possui atividade hemaglutinante e é resistente ao clorofórmio, temperaturas altas e pH igual ou maior que 3 (ALLAN et al., 1994).

O PCV é classificado no gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*, a qual engloba outros circovírus de animais, tais como o vírus da doença do bico e das penas das aves, o circovírus do ganso, o circovírus do canário e o circovírus da pomba (PRINGLE, 1999).

Dois tipos geneticamente distintos de PCV são atualmente reconhecidos, o PCV tipo 1 (PCV1) e o tipo 2 (PCV2). O PCV1 possui genoma de 1759 pb, enquanto que o PCV2 possui 18 a 19 nucleotídeos adicionais (MEEHAN et al., 1998). A homologia da seqüência de nucleotídeos entre isolados do mesmo tipo é maior que 90 %, enquanto que entre isolados de tipos diferentes é de 68-76 % (CHEUNG, 2003a; KIM e LYOO, 2002; MOROZOV et al., 1998).

O PCV1 foi primeiramente descrito como um contaminante de células de rim de suíno (PK-15 ATCC CCL-33) e é considerado não patogênico para suínos (ALLAN et al., 1995, TISCHER et al., 1982), enquanto que o PCV2 é tido como o principal agente infeccioso envolvido na Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) (ALLAN et al., 1999a; BOLIN et al., 2001; KENNEDY et al., 2000). A SMDS é uma doença emergente no rebanho suíno mundial, desde sua ocorrência em 1991 no Canadá (HARDING e CLARK, 1997). Outras síndromes e manifestações clínicas tem sido associadas ao PCV2, tais como a Síndrome da Dermatite e Nefropatia dos Suínos (SDNS) (ALLAN et al., 2000a; CHAE, 2005; CHOI e CHAE, 2001; ROSELL et al., 2000; THIBAUT et al., 1998), falhas reprodutivas (JOSEPHSON e CHARBONNEAU, 2001; KIM et al., 2004; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001; WEST et al., 1999), doenças do complexo respiratório dos

suínos (CDRS) (ELLIS et al., 1999a) e tremor congênito (TCS) (STEVENSON et al., 2001; KENNEDY et al., 2003).



**FIGURA 1** - Estrutura do capsídeo do PCV. (A) Microscopia eletrônica, aumento de 250.000 vezes. A barra indica 100 nm. Adaptado de McNulty (2006). (B) Mapa tridimensional do PCV2. Adaptado de Crowther et al. (2003).

#### 1.1.1. Organização genômica

O PCV2 tem um genoma de 1767 a 1768 nucleotídeos (MEEHAN et al., 1998) e dois genes principais, o *rep* e o *cap*. O *rep* tem uma fase de leitura aberta, a ORF1, que se estende do nucleotídeo 51 ao 995 e está localizada na fita viral positiva (Figura 2). O *cap* localizado na ORF2 da fita viral negativa, se estende do nucleotídeo 1735 ao 1034. Na região intergênica está a origem de replicação do DNA (ORI), onde duas proteínas Rep ligam-se a uma estrutura palindrômica e iniciam o processo de replicação do tipo “circulo rolante” (MANKERTZ et al., 2004). A proteína Cap tem função estrutural (NAWAGITGUL et al., 2000). Recentemente foi caracterizada uma proteína viral associada à indução da apoptose, localizada na ORF3 da fita viral negativa se estendendo no nucleotídeo 671 ao 375 (LIU et al., 2005).

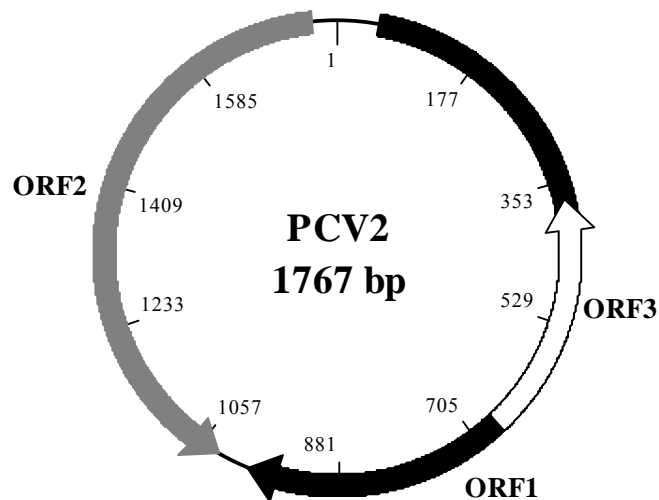
##### 1.1.1.1. Proteínas do *rep*

O gene *rep* codifica duas proteínas essenciais para a replicação, a Rep e a Rep’ (CHEUNG, 2003b). A proteína Rep possui 312 aminoácidos, sendo a tradução

completa da ORF1, enquanto que a Rep' possui 168 aminoácidos e é o produto da clivagem do mRNA transcrito da ORF1 (MANKERTZ e HILLENBRAND, 2001). Experimentos mostraram que a Rep reconhece o “braço” direito do palíndromo, enquanto que a Rep' reconhece os seis nucleotídeos proximais da seqüência repetida na origem de replicação (STEINFELDT et al., 2001) e somente se ambas forem expressas simultaneamente a replicação do DNA viral ocorre (MARKERTZ E HILLENBRAND, 2001).

Em células infectadas, os dois transcritos, Rep e Rep' aparecem em quantidades similares 12 horas após transfecção (hpt). Em 24 e 36 hpt a Rep' é predominante e o número de transcritos desta diminui a partir de 48-96 hpt. A regulação da transcrição do gene *rep* é realizada por um promotor localizado imediatamente ao início do gene e este promotor é negativamente regulado pela proteína Rep (MARKERTZ e HILLENBRAND, 2003).

Outros seis RNAs, três associados a *Rep* (*Rep3a*, *Rep3b* e *Rep3c*), e três RNAs associados a proteínas não estruturais (NS515, NS672 e NS0) foram detectados em cultivos celulares infectados com PCV2, porém estes parecem não estarem envolvidos com a síntese de proteína viral ou replicação do capsídeo (CHEUNG, 2003b).



**FIGURA 2** - Representação esquemática do genoma circular do PCV2. A ORF3 (em branco) está sobreposta à ORF1 (em preto). A ORF2 (em cinza) e ORF3 são transcritas a partir da fita viral negativa, enquanto que a ORF1 da fita viral positiva.

#### 1.1.1.2. Proteína do *cap*

A ORF2 do PCV2 foi clonada e expressa em células de insetos. A proteína sintetizada apresentou massa molecular de 30 kDa, similar à detectada em partículas virais purificadas. Quando visualizadas por meio de microscopia eletrônica a proteína recombinante da ORF2 foi capaz de se auto-encapsidar, formando partículas semelhantes à de capsídeos, sugerindo que a ORF2 codifica a principal proteína estrutural do capsídeo (NAWAGITGUL et al., 2000). Em outro experimento, animais inoculados com baculovírus recombinante ou vacinas de DNA que contém a ORF2 apresentaram produção de anticorpos contra PCV2, demonstrando que a proteína expressa é imunogênica (BLANCHARD et al., 2003; FENAUX et al., 2003). Testes de imunofluorescência e ELISA para pesquisa de anticorpos, utilizando como antígeno total o PCV2 ou a proteína codificada pela ORF2 do PCV2, produziram resultados similares, sugerindo que a proteína codificada pela ORF2 é imunodominante (NAWAGITGUL et al., 2002). Aparentemente os epitopos imunodominantes localizados nos resíduos de aminoácidos 47 a 84, 165 a 200 e nos últimos quatro aminoácidos da proteína (LEKCHAROENSUK et al., 2004).

#### 1.1.1.3. Proteína codificada pela ORF3

A proteína codificada pela ORF3 é expressa predominantemente no núcleo e com menor frequência no citoplasma de células. Esta proteína viral do PCV2 não é necessária para a replicação viral, entretanto está envolvida no processo de indução da apoptose pela ativação da rota iniciador caspase-8 e efetor caspase-3 (LIU et al., 2005). Indícios sugerem que esta proteína teria um importante papel na patogenia viral. Um vírus mutante produzido de modo a não expressar a proteína codificada pela ORF3, não induziu lesões, mas foi capaz de se replicar eficientemente em camundongos, diferentemente do tipo selvagem (LIU et al., 2006).

### 1.1.2. Ciclo viral

Os mecanismos de multiplicação viral ainda não foram completamente elucidados, porém alguns destes vem sendo estudados nos últimos anos e são descritos a seguir.

#### 1.1.2.1. Adsorção

O PCV2 utiliza glicosaminoglicanos como um de seus receptores celulares. Quando o vírus foi incubado previamente com sulfato de heparina ou sulfato de condroitina B, os títulos do vírus foram significativamente reduzidos de maneira dose-dependente, indicando que o vírus utiliza estes glicosaminoglicanos como receptores para sua adsorção nas células hospedeiras. Porém, o fato do vírus infectar células CHO mutantes que não expressam glicosaminoglicanos indica que, além do sulfato de heparina e do sulfato de condroitina B, outras moléculas não identificadas participam da adsorção do vírus (MISINZO et al., 2006).

#### 1.1.2.2. Penetração

Um dos mecanismos utilizados pelo vírus para penetrar nas células é a endocitose mediada por clatrina. O uso de inibidores deste tipo de endocitose impediu a infecção de células de linhagem 3D4/31 (MISINZO et al., 2005). Resultados similares foram obtidos em células dendríticas quando incubadas com clorpromazina, um inibidor da endocitose dependente de clatrina, ou com citocalasina, um inibidor da formação do citoesqueleto (VINCENT et al., 2005). Os mesmos autores sugerem que o processo de internalização não ocorreria por macropinocitose, ou seja, através da formação de grandes vesículas pinocíticas com conteúdo extracelular, uma vez que células dendríticas maduras podem internalizar o PCV2 e estas não possuem atividade macropinocítica.

Células de linhagem 3D4/31, derivadas de macrófagos alveolares suínos, inoculadas com PCV2, apresentaram quantidade máxima de vírus adsorvido após 30

minutos de incubação, sendo que a internalização ocorreu em até 6 horas (MISINZO et al., 2005).

### 1.1.2.3. Replicação

Depois de internalizado o virion, faz-se necessária a acidificação endosomal (MISINZO et al., 2005). Após, acredita-se que o genoma viral assumam formas replicativas intermediárias de fita dupla, sintetizadas a partir da fita molde do genoma do PCV2, semelhante ao que ocorre com os geminivírus (GUTIERREZ, 1999). Uma vez que o circovírus não sintetiza sua própria DNA polimerase para a produção de formas replicativas intermediárias, ele depende de DNA polimerases do hospedeiro para completar seu ciclo de replicação (TISCHER et al., 1987). Baseado no ciclo replicativo do PCV2, que necessita de células em mitose para se replicar, a co-infecção de agentes que causam morte celular e levam à regeneração do tecido podem indiretamente auxiliar na replicação do PCV2, assim como a adição de citocinas e outros fatores de crescimento que afetam a divisão celular (ELLIS et al., 2004).

Estudos de cinética de replicação do PCV2 concluíram que em células PK-15, a proteína do capsídeo é expressa entre 6-12 horas pós-inoculação (hpi) e é deslocada para o núcleo 12 a 24 hpi, ao mesmo tempo em que a proteína Rep é detectada no núcleo. Os mesmos autores observaram esta seqüência de eventos em cardiomiócitos fetais e macrófagos alveolares suínos, porém nestas células os antígenos nucleares aparecem 48 hpi e em menor proporção (MEERTS et al., 2005a). Antígenos do PCV2, em células PK-15, foram detectados no citoplasma e núcleo de células infectadas 18 hpi e as partículas virais foram liberadas 32 hpi (CHEUNG e BOLIN, 2002). Este ciclo de replicação difere do observado em monócitos e macrófagos, nos quais a proteína do capsídeo do PCV2 é detectada no citoplasma, mas nenhuma evidência de replicação é observada (GILPIN et al., 2003).

*In vivo*, antígenos de PCV2 são detectados 14 dias pós-infecção (dpi) no baço, glândula salivar, linfonodos mesentéricos e parotídeos e 26 dpi em todos os tecidos; sendo encontrado em maior proporção nos pulmões, glândulas salivares, fígado, rim, tecidos linfóides e intestino (ALLAN et al., 2000b).

### 1.1.3. Caracterização genética

A homologia entre seqüências de nucleotídeos do PCV1 e PCV2 é de 68-76% (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1998). Quando as ORFs foram comparadas individualmente entre PCV1 e o PCV2, concluiu-se que a ORF1 é a mais conservada, apresentando homologia de 83% para nucleotídeos e 86% para aminoácidos (MOROZOV et al., 1998). Já ORF3 é a mais variável, com 61,5% de homologia para aminoácidos (LIU et al., 2005) enquanto que a ORF2, apresenta 67% de homologia para os nucleotídeos e 65% de homologia para aminoácidos (MOROZOV et al., 1998).

A análise de 148 seqüências de PCV2 e de PCV1 não permitiu determinar o *status* ancestral dos PCVs, porém sugeriu uma origem comum para ambos os vírus (OLVERA et al., 2007). No mesmo estudo, as seqüências de PCV2 foram agrupadas em oito grupos, mas nenhum tipo de associação com virulência ou região geográfica foi observada. Entretanto, outros estudos associaram variações genéticas de PCV2 à origem geográfica dos isolados, mas não à virulência (LAROCHELLE et al., 2002; de BOISSESON et al., 2004; GRIERSON et al., 2004a; FENEUX et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000; MEEHAN et al., 2001).

## 1.2. Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos

A SMDS é uma doença viral que ocorre em leitões desmamados, caracterizada pela perda de peso, sinais respiratórios e icterícia, tendo como principal agente etiológico o PCV2 (HARDING e CLARK, 1997; ALLAN e ELLIS, 2000, 1999a; CHOI e CHAE, 2000). Atualmente a SMDS é endêmica em muitos países, sendo a principal causa de refugagem em rebanhos suínos (CHAE, 2004).

### 1.2.1. Histórico

Estudos sorológicos e moleculares mostraram que o PCV2 tem distribuição global e esteve presente na população de suínos pelo menos durante os últimos 30 anos (ALLAN e ELLIS, 2000; GRIERSON et al., 2004b; WALKER et al., 2000). Entretanto a SMDS foi primeiramente descrita em 1991, em rebanhos suínos canadenses

(HARDING e CLARK, 1997) e, desde então, adquiriu um caráter endêmico (ALLAN e ELLIS, 2000; CHAE, 2004) sendo relatada na Ásia, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania (SEGALÉS et al., 1997; ALLAN et al., 1998; SPILANE et al., 1998; ONUKI et al. 1999; WELLENBERG et al. 2000; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2001; TRUJANO et al., 2001; SARRADELL et al., 2002). Usualmente encontrada em rebanhos comerciais de suínos, foi também diagnosticada em javalis selvagens (SCHULZE et al., 2004).

No Brasil a SMDS foi descrita pela primeira vez em 2001 (CIACCI-ZANELLA et al., 2001). Em 2002, a enfermidade foi relatada na região Sudeste (FRANÇA et al., 2005) e, no Rio Grande do Sul, foi descrita pela primeira vez em 2003 (PESCADOR et al., 2003). Porém, estudos moleculares mostram que o PCV2 encontrava-se na população suína do Brasil desde pelo menos 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006).

### 1.2.2. Etiologia

Sinais clínicos e lesões histopatológicas observados na SMDS são induzidos pela inoculação de PCV2 em suínos (KENNEDY et al., 2000). Porém, sugere-se que para o completo desenvolvimento da síndrome, há a necessidade de co-infecção com outros agentes infecciosos como o parvovírus suíno ou vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos (ALLAN et al., 1999a; CHOI e CHAE, 2000; HARMS et al., 2001) ou co-fatores imunoestimulatórios (KRAKOWKA et al., 2001; KYRIAKIS et al., 2002). Estes experimentos são descritos no item “Modelos experimentais da SMDS”.

### 1.2.3. Epidemiologia

O vírus é amplamente disseminado na população suína, estudos mostram que a soroprevalência do PCV2 chega a 100% em animais em fase de terminação e nenhuma granja apresentou todos animais soronegativos em seu plantel (LAROCHELLE et al., 2003). Em média, a porcentagem de animais soropositivos nos rebanhos americanos é de 50% (NAWAGITGUL et al., 2002).

A população de javalis também apresenta anticorpos séricos contra PCV2. Em rebanhos de javalis criados livres, cercados ou submetidos a manejo intensivo, 48% dos



animais apresentaram títulos de anticorpos médios ou altos (igual ou maior que 320) sendo que o grupo de animais intensamente manejados foi o que apresentou uma maior prevalência, 81,8% (VICENTE et al., 2004).

A rota primária de transmissão do PCV2 ainda não foi determinada, porém evidências sugerem que o PCV2 possa ser transmitido horizontalmente e verticalmente. O vírus tem sido detectado em amostras de suabes nasais, bronco-traqueais, orofaríngeos, fecais e da urina de suínos clinicamente acometidos pela síndrome (SHIBATA et al., 2003; SEGALÉS et al., 2005), assim como de animais clinicamente sadios (SEGALÉS et al., 2005).

O isolamento de PCV2 de fetos abortados sugere a possibilidade de transmissão vertical (MEEHAN et al., 2001). A detecção de PCV2 no sêmen de reprodutores infectados naturalmente (KIM et al., 2001) e experimentalmente (LAROCHELLE et al., 2000) indicam que ocorra a transmissão viral de reprodutores para as fêmeas e suas respectivas proles. A detecção do PCV2 em amostras de colostro indicam que possivelmente a prole seja também infectada via oral (SHIBATA et al., 2006).

A manifestação clínica da doença ocorre em animais na 5<sup>a</sup> a 16<sup>a</sup> semana de vida (ALLAN e ELLIS, 2000; HARDING e CLARK, 1997; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; PALLARES, 2002), apresentando baixa taxa de morbidade, porém alta taxa de mortalidade. Nas propriedades onde há relatos de SMDS, aproximadamente 5-20% dos leitões desmamados apresentam sinais compatíveis com a síndrome, sendo que a mortalidade pode chegar a 80% (DARWICH et al., 2004).

#### 1.2.4. Patogenia

A maioria dos animais não apresentam doença clínica, porém se infectam com PCV2 e soroconvertem (QUINTANA et al., 2001). Não se sabe ao certo o que determina o grau de susceptibilidade à doença que alguns animais. Porém alguns autores sugerem que para o completo desenvolvimento da síndrome, exista a necessidade de co-infecções virais (ALLAN et al., 1999a; CHOI e CHAE, 2000; HARMS et al., 2001) ou co-fatores imunoestimulatórios (KRAKOWKA et al., 2001; KYRIAKIS et al., 2002).

Outros fatores associados à manifestação clínica da síndrome são a presença de infecções bacterianas, causadas por agentes como o *Mycoplasma hyopneumoniae*

(OPRIESSNIG et al. 2004) e a *Pasteurella multocida* (LAISON et al., 2002; THOMSON et al., 2001). Evidências sugerem que bactérias que contêm lipopolisacarídeos (LPS), como as Gram-negativas, poderiam estimular a replicação viral e contribuir no desenvolvimento da SMDS. Macrófagos alveolares de suínos tratados com LPS bacterianos tiveram diminuição do sinal intracitoplasmático para PCV2, porém o sinal intranuclear aumentou, assim como o título viral e a expressão da proteína do capsídeo, indicando que o LPS agiria como um fator estimulatório na replicação viral (CHANG et al., 2006).

Antígenos e material genético do PCV2 têm sido detectados em vários tipos de células. O material viral tem sido encontrado principalmente no citoplasma de histiócitos e células da linhagem monocítica/macrofágica, tais como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas (GILPIN et al., 2003; ROSELL et al., 1999).

Lesões hepáticas predominantes têm sido descritas, como necrose (BOLIN et al., 2001; KRAKOWKA et al., 2000; KRAKOWKA et al., 2001) ou apoptose (KIUPEL et al., 2005). Com base em mudanças histopatológicas em suínos experimentalmente e naturalmente infectados, parece que o vírus é capaz de induzir apoptose *in vivo*. Porém, as taxas de apoptose em tecidos linfóides foram inversamente proporcionais à carga viral no soro e à severidade de lesões, indicando que a apoptose não é uma característica marcante na SMDS (RESENDES et al., 2004a). Recentemente, a ORF3 do PCV2 tem sido descrita como um fator responsável para a ocorrência da apoptose *in vitro* (LIU et al., 2005), porém não é necessária na replicação viral (LIU et al., 2006).

A virulência entre isolados de PCV2 parece diferir, apesar das diferenças genéticas entre isolados de PCV2 serem menores que 5%. Animais SPF inoculados com PCV2 isolado de lesões linfóides e PCV2 não associado a lesões, os quais apresentavam 98,9% de identidade da seqüência, tiveram padrões de replicação e patogenia distintos. O isolado associado a lesões linfóides apresentou carga viral maior do 14º ao 28º dia p.i. e lesões microscópicas mais severas que o isolado não associado a lesões (OPRIESSNIG et al., 2006).

Infecções causadas por PCV2 têm uma evolução crônica. Em animais inoculados com PCV2 que não desenvolveram a doença, observou-se uma viremia a partir do 7º dia, com pico virêmico no 21º dia pi, seguido da redução gradual da carga viral observada até o 69º dia pi (RESENDES et al., 2004b).

### 1.2.5. Aspectos imunológicos

O comprometimento imunológico em animais com SMDS é evidente, uma vez que ocorre depleção linfóide (ROSELL et al., 1999; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002) e infecções de patógenos oportunistas, como *Pneumocystis carinii*, *Chlamydia* spp e *Aspergillus* spp., nos pulmões de animais acometidos (HARDING e CLARK, 1997; SEGALÉS e DOMINGO, 2002). A imunossupressão induzida com ciclosporina, um agente imunossupressor forte, produz um quadro clínico mais grave da doença que animais tratados com corticóides, agentes imunossupressores fracos (KRAKOWKA et al., 2002). Os mecanismos da interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro são descritos a seguir.

#### 1.2.5.1. Perfil de expressão de citocinas *in vivo* e *in vitro*

A linfopenia induzida por PCV2 em animais sintomáticos levou à hipótese que eventos imunossupressores seguidos de infecção por PCV2 teriam um importante papel no desenvolvimento de doenças associadas ao vírus (NIELSEN et al., 2003). Sabe-se também que o vírus se associa a células da linhagem monocítica *in vivo* (ROSELL et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2002) e *in vitro*, sem mostrar qualquer sinal de replicação (GILPIN et al., 2003; VINCENT et al., 2003). A habilidade do vírus de se replicar e persistir por um longo tempo no organismo indica uma falha na resposta imunológica do hospedeiro em reconhecer ou remover as partículas virais e as células infectadas (MEERTS et al., 2006).

O genoma do PCV2 possui seqüências que podem ter efeito imunomodulador. Baseado no critério Krieg et al. (2002), o genoma do PCV2 apresenta uma proporção de 60% e 40% de motivos CpG (citosina-fosforotiato-guanina não metilada) estimulatórios e inibitórios, respectivamente. Cinco seqüências baseadas no genoma do PCV2 foram testadas e se verificou que uma delas apresentava efeito inibitório na produção de IFN- $\alpha$  pelas células monocíticas do sangue periférico (HASSLUNG et al., 2003).

Células naturalmente produtoras de interferon (NIPC) reconhecem motivos CpG via TLR9, e a partir daí produzem uma resposta imune (HEMMI et al, 2000). O PCV2 tem a capacidade de bloquear a produção de IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  induzida por CpG em NIPC (VINCENT et al., 2005). Como as NIPC são as principais fontes dessas citocinas,

conseqüentemente a resposta imune inata dependente de Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) (tais como efeito antiviral direto, maturação de células apresentadoras de antígenos e ativação de células NK), assim como ativação de resposta celular T e B específicas, podem se tornar de alguma forma ineficazes (FITZGERALD-BOCARSLY, 2002).

A capacidade do vírus de bloquear a produção de IFN- $\alpha$  induzida por motivos CpG está diretamente relacionada à quantidade viral presente e é, em sua maioria, mediada pelo DNA de PCV2 não associado ao capsídeo. Quando avaliada a produção de IFN- $\alpha$  induzida por motivos CpG, o DNA de PCV2 apresentou uma atividade inibitória maior que o DNA de PCV1. Porém, a inibição das NIPC pelo DNA de PCV2 não foi restrita a agonistas de TLR9; e o PCV2 interferiu também na resposta de IFN- $\alpha$  das NIPC induzida por agonistas de TLR7 e outros vírus, como vírus da pseudo-raiva, vírus da Peste Suína Clássica e o vírus da Gastroenterite Transmissível, vírus estes que diferem significativamente nas suas vias de sinalização (VINCENT et al., 2007).

O importante papel das NIPCs na imunidade antiviral inata pode indicar que a atividade inibitória antiviral é o evento chave na patogênese das doenças associadas ao PCV2 (VINCENT et al., 2007), uma vez que o vírus necessita de agentes virais, bacterianos e co-fatores para a manifestação completa da síndrome (ALLAN et al., 1999a; CHOI e CHAE, 2000; HARMS et al., 2001, KRAKOWKA et al., 2001; KYRIAKIS et al., 2002).

O PCV2 também altera o perfil de secreção de citocinas em macrófagos infectados pelo vírus. Tem sido sugerido que as lesões granulomatosas observadas nos casos de SMDS seriam induzidas pela associação do PCV2 a macrófagos. Esta infecção aumentaria a produção de citocinas, como a proteína monocítica quimiotática 1 (MCP-1) e a proteína macrofágica inflamatória 1 (MIP-1), que levariam a inflamações granulomatosas (KIM e CHAE, 2004). Macrófagos alveolares, quando incubados com PCV2, aumentam a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-8, AMCF-II (fator quimiotático neutrofílico II derivado de macrófagos alveolares), G-CSF (fator estimulatório de colônias de granulócito) e MCP-1. Estes fatores levam ao recrutamento de células inflamatórias da fase aguda e é especulado que isto desencadearia o desenvolvimento de uma pneumonia intersticial em suínos acometidos pela síndrome (CHANG et al., 2005).

Suínos com SMDS têm padrões alterados de mRNA que expressam citocinas. Ocorre um aumento do mRNA que expressa a IL-10 no timo e IFN- $\gamma$  nas tonsilas. O

aumento de IL-10 tem sido associado à depleção e atrofia tímica em animais doentes. A diminuição da expressão de mRNA foi observada para IL-2 no baço, IL-4 nas tonsilas e linfonodos, IL-12p40 em linfonodos inguinais e esplênicos e IFN- $\gamma$  e IL-10 em linfonodos inguinais. Estes achados, associados ao fato da redução de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue e depleção e atrofia tímica, são indicativos de uma imunossupressão de células T, o que prejudicaria o sistema imune de suínos afetados pela síndrome (DARWICH et al., 2003a).

Células mononucleares do sangue periférico derivadas de animais com SMDS não produziram níveis normais de IFN- $\gamma$  ou IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 ou IL-8 quando desafiadas com fitohemaglutinina ou superantígenos, mas produziram IFN- $\gamma$  ou IL-10 quando desafiadas com antígenos de PCV2, evidenciando que animais com SMDS tem uma redução na habilidade de realizar suas funções imunológicas normais quando expostos a vírus ou moléculas imunoestimulatórias (DARWICH et al., 2003b).

#### 1.2.5.2. Resposta mediada por anticorpos frente ao PCV2

Os anticorpos adquiridos via colostro contra PCV2 presentes em leitões de três semanas de idade gradualmente diminuem até o limite mínimo na décima primeira semana de vida (LAROCHELLE et al., 2003). A proteção conferida por anticorpos maternos contra PCV2, parece ser título dependente. Títulos altos de anticorpos, obtidos no teste de ELISA, são geralmente protetores enquanto que títulos baixos não (McKEOWN et al., 2005).

Animais inoculados experimentalmente soroconvertem 14 a 28 dpi (KRAKOWKA et al., 2001; NAWAGITGUL et al., 2002), e os níveis de anticorpos aumentam gradualmente até pelo menos o 49º dia (NAWAGITGUL et al., 2002). Suínos expostos ao PCV2 sob condições de campo soroconvertem entre 7 e 12 semanas de vida, e o título se mantém elevado pelo menos até a vigésima oitava semana de vida, porém uma porcentagem dos animais se mantém virêmicos, sugerindo que os anticorpos detectados não são protetores (RODRIGUES-ARRIOJA et al., 2002).

Animais SPF inoculados com PCV2, aumentaram gradativamente os níveis de IgM até o final do experimento, 21º dpi, enquanto que nos animais afetados pela síndrome os títulos de IgM começaram a cair a partir do 10º dpi e foram

significativamente inferiores no 21º dpi em relação ao grupo não inoculado. Os níveis de IgG1, IgG2 e IgA foram levemente menores nos animais acometidos pela síndrome. Neste mesmo estudo, observou-se que a ausência de anticorpos neutralizantes está relacionada com altas taxas de replicação viral e com a manifestação clínica da síndrome (MEERTS et al., 2006).

A resposta mediada por anticorpos frente a PCV1 e PCV2 é tipo-específica, para a proteína do capsídeo. Mahé et al., (2000) expressando a proteína Rep do PCV1 e PCV2 através de baculovírus ou vetores plasmidiais, verificaram que anticorpos policlonais anti-PCV2 apresentaram reatividade cruzada para PCV1. O mesmo não ocorreu quanto foi expressa a proteína do capsídeo, que induziu uma resposta tipo-específica. Resultados similares foram obtidos por Allan et al. (1999b) que, utilizando soro hiperimune de coelho contra PCV2 para imunofluorescência indireta, verificaram que os mesmos reagiram fortemente contra PCV2, mas não reagiram contra PCV1.

#### 1.2.5.3. Células associadas à imunidade inata e específica

Animais com SMDS apresentam monocitose, neutrofilia, linfopenia e diminuição de células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> (DARWICH et al., 2003a; DARWICH et al., 2002). Nielsen et al. (2003), estudando a cinética da infecção por PCV2, verificaram uma redução na população de células B e T a partir do 7º dpi e no 21º dpi os níveis caíram para  $2 \times 10^5$ /ml e  $5 \times 10^5$ /ml, respectivamente. O subgrupo de células T mais afetado foi o de linfócitos T auxiliares ativados de memória (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e também foi observada diminuição de células NK.

#### 1.2.6. Sinais clínicos

A SMDS acomete leitões de 5 a 16 semanas de idade (ALLAN e ELLIS, 2000; HARDING e CLARK, 1997; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; PALLARES, 2002). É caracterizada pela perda progressiva de peso, dispnéia, aumento do volume dos linfonodos e, menos freqüentemente, palidez, icterícia e diarreia (ELLIS et al., 1998; HARDING et al. 1998, ALLAN et al. 1999a; ALLAN e ELLIS, 2000; CHOI e CHAE, 1999). Em granjas que apresentaram surtos da doença, 5-20% dos suínos entre 7 a 15

semanas foram acometidos e os índices de mortalidade foram superiores a 80% (DARWICH et al., 2004). Em animais convalescentes, os sinais clínicos e lesões linfóides são semelhantes aos encontrados nos estágios iniciais da doença (QUINTANA et al., 2001).

#### 1.2.7. Lesões macro e microscópicas

Suínos com SMDS mostram diferentes graus de definhamento, linfadenopatia generalizada, falta de colabamento pulmonar e atrofia tímica. Menos freqüentemente, podem apresentar atrofia hepática e lesões renais (ALLAN e ELLIS, 2000; KIM et al., 2003; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002). No Brasil, as principais lesões macroscópicas observadas em 97 animais necropsiados foram aumento no volume dos linfonodos (80,4%) e pulmões não-colapsados (65,9%) (CORRÊA et al., 2006).

A SMDS apresenta duas lesões microscópicas características: inflamação granulomatosa e presença de corpúsculos de inclusões intracitoplasmáticos. A inflamação granulomatosa é observada nos linfonodos, fígado, baço, timo, placas de Peyer e linfonodos inguinais superficiais, consistindo de um infiltrado de células epitelióides e células gigantes multinucleadas (CHAE, 2004).

Os corpúsculos de inclusões intracitoplasmáticos são grandes, numerosos e basofílicos, sendo observados no citoplasma de histiócitos e células gigantes multinucleadas (CHAE, 2004; ALLAN e ELLIS, 2000; GILPIN et al., 2003, ROSELL et al., 1999). Esporadicamente é possível detectar o vírus no citoplasma de células renais, epitélio respiratório, endotélio vascular e no núcleo de monócitos, macrófagos, células da musculatura lisa, hepatócitos e enterócitos (ROSELL et al., 2000; ROSELL et al., 1999).

Animais doentes ainda apresentam depleção linfóide com infiltração histiocística. Estas lesões, nos gravemente acometidos, são observadas em praticamente todos os tecidos, incluindo os linfonodos, tonsilas, placas de Peyer, baço e timo (ROSELL et al., 1999).

### 1.2.8. Diagnóstico

O PCV2 pode ser detectado em animais sadios, portanto a simples detecção da presença viral não é confirmatória para a síndrome. Para diagnóstico de SMDS deve ser observada presença de sinais clínicos compatíveis, presença de PCV2 nas lesões e presença de lesões microscópicas características, como depleção linfóide severa à moderada ou linfadenite granulomatosa (CHAE, 2004). A determinação da carga viral pode ser empregada como ferramenta auxiliar, uma vez que alguns autores sugerem o limite de  $10^7$  cópias do genoma viral por ml de sangue ou soro para considerar o diagnóstico da SMDS (LIU et al., 2000; OLVERA et al., 2004).

### 1.2.9. Controle e prevenção

#### 1.2.9.1. Práticas de manejo

Tentativas de erradicação do PCV2, pela retirada de todos animais da granja falharam, sendo que o PCV2 e a SMDS retornaram rapidamente após repovoação (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Isto provavelmente se deve ao fato do vírus estar largamente distribuído na população suína.

Algumas medidas de manejo têm mostrado algum sucesso na redução da ocorrência de SMDS. Essas medidas incluem redução do nível de *stress* no rebanho, melhora na higiene, limitação na mistura de grupos por faixa etária, uso do sistema *all in-all out*, aumento da qualidade do ar e isolamento dos animais doentes (GUILMOTO e WESSEL-ROBERT, 2002). O uso de soro terapia tem reduzido as perdas por SMDS em rebanhos (WADDILOVE e MARCO, 2002), porém este procedimento requer a colheita de soro hiperimune, o que é trabalhoso e aumenta o risco de reintrodução de agentes patogênicos no rebanho.

A desinfecção do ambiente pode ser uma medida auxiliar na tentativa de redução da pressão infectante, uma vez que o título do agente diminui quando tratado com fenóis, amônia quaternária, agentes oxidantes e álcalis. Não foi observada redução significativa no título quando o vírus é exposto a etanol, iodo, formaldeído ou clorexidine (ROYER et al., 2001).



### 1.2.9.2. Vacinas em desenvolvimento

Um entrave importante no desenvolvimento de vacinas contra PCV2 é a dificuldade de reprodução, sob condições experimentais, dos sinais clínicos das síndromes associadas a este agente. Conseqüentemente, a eficácia de candidatos a vacinas não pode ser estabelecida de forma adequada. Três tipos de vacinas estão atualmente em progresso e estão abaixo descritas.

#### 1.2.9.2.1. Vacinas de DNA de PCV2

Tentativas de imunização com vacinas de DNA vêm sendo realizadas em modelos animais. Camundongos imunizados com um vetor de expressão contendo o gene *cap* aumentaram consideravelmente seus níveis séricos de anticorpos contra PCV2 (KAMSTRUP et al., 2004). Suínos vacinados com DNA plasmidial recombinante no qual foi inserido o gene *cap* e *rep*, soroconverteram uma semana após o desafio, enquanto que o grupo controle soroconverteu na semana posterior e apresentou redução no ganho de peso em relação ao grupo vacinado (BLANCHARD et al., 2003). Vacinas de DNA podem proteger bem contra uma infecção de desafio, entretanto nenhuma vacina de DNA até o presente momento se encontra no mercado.

#### 1.2.9.2.2. Vacinas de proteínas de PCV2 produzidas em baculovírus

Blanchard et al. (2003) expressaram proteínas de PCV2 em células de inseto utilizando baculovírus recombinante. Estes autores compararam a eficácia de vacinas de DNA com a eficácia de uma vacina de subunidade preparada com proteínas Rep e Cap de PCV2 produzidas em baculovírus em um experimento de vacinação/desafio em suínos. Foi demonstrado que a vacina de proteínas produzida por baculovírus foi melhor do que a vacina de DNA. Já o uso de uma vacina de DNA de PCV2 em combinação com uma vacina de proteína recombinante feita em baculovírus, em um protocolo chamado de “prime-boost”, não apresentou vantagem.

#### 1.2.9.2.3. Vacinas de vetores virais contra PCV2

PCVs recombinantes foram produzidos trocando o gene *cap* do PCV1 pelo gene *cap* do PCV2 (PCV1-2) e vice-versa (PCV2-1). Os títulos virais dos recombinantes

apresentaram perfis similares aos do PCV2, porém foram inferiores ao do PCV1, o que se deve provavelmente ao fato do PCV1 estar mais adaptado à linhagem celular PK-15. Quando os suínos foram inoculados com o DNA infeccioso do clone PCV1-2, estes produziram anticorpos contra PCV2 e apresentaram lesões microscópicas menos graves, redução na viremia e na detecção de antígenos em tecidos linfóides, quando comparados ao grupo inoculado com DNA infeccioso de PCV2 (FENEALUX et al., 2003). Animais vacinados com PCV1-2 e desafiados com PCV2 foram protegidos no desafio, sugerindo a possibilidade do vírus quimérico ser usado como vacina (FENEALUX et al., 2004).

Um recombinante do vírus da doença de Ausjesky (PRV) foi construído com um cassete de expressão da proteína de fusão Rep-Cap. O recombinante induziu respostas imunes humorais e celulares anti-PCV2 em camundongos (JU et al., 2005). Outro PRV recombinante foi produzido através de recombinação homóloga, no qual foi inserido o gene *cap* do PCV2 e deletado o gene da Timidina Kinase e da glicoproteína E do PRV. O recombinante induziu resposta imune humoral e celular contra PCV2 nos suínos vacinados, porém os níveis da resposta celular medidos em ensaios de linfoproliferação não foram satisfatórios (SONG et al., 2007).

A imunização de camundongos com um adenovírus recombinante expressando o gene *cap* do PCV2 demonstrou induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra PCV2 (WANG et al., 2006), porém este candidato a vetor vacinal deve ainda ser testado no hospedeiro adequado.

#### 1.2.10. Modelos experimentais da SMDS

Infecções de PCV2 em leitões gnotobióticos (GN), privados da ingestão de colostro (PIC) ou amamentados com colostro (AC), tem sido utilizadas para o esclarecimento do papel do PCV2 na patogenia da síndrome. Inoculações experimentais com PCV2 tem produzido sinais clínicos de SMDS e atualmente é aceito que o vírus é o agente causal da doença. Todavia parece que a severidade da doença aumenta com a presença de co-infecções ou de imunoestimulação (ALLAN et al., 2004) e a reprodução total da síndrome ainda é um desafio.

#### 1.2.10.1. Leitões gnotobióticos

A primeira reprodução experimental consistente da SMDS foi descrita por Ellis et al. (1999b), no qual foi inoculado PCV2 em leitões GN, conseguindo reproduzir as lesões, porém posteriormente descobriu-se que o inóculo estava contaminado com parvovírus suíno (PPV), levando a especulações que o PCV2 sozinho não reproduziria a doença.

Em um estudo de co-infecção leitões GN foram infectados com PCV1, PCV2 e PPV, isolados ou em combinação. Os animais inoculados com PCV2 não desenvolveram a doença clínica, porém apresentaram hepatite linfoplasmocítica moderada. Animais co-infectados com PCV2 e PPV desenvolveram doença clínica severa e lesões macroscópicas de SMDS (KRAKOWKA et al., 2000).

Leitões inoculados com PCV2 e imunoestimulados com *keyhole limpet haemocyanin* em adjuvante de Freund's incompleto (KLH/AFI) desenvolveram a doença clínica e tiveram lesões micro e macroscópicas consistentes de SMDS, enquanto que em leitões não imunoestimulados foi observada uma forma moderada da doença (KRAKOWKA et al., 2001).

#### 1.2.10.2. Leitões privados da ingestão de colostro

Allan et al. (1999a) inocularam PCV2 em leitões PIC e observaram que um leitão de quatro desenvolveu SMDS e lesões histológicas severas, enquanto os demais permaneceram clinicamente saudáveis, porém com lesões histológicas leves a moderadas. Neste mesmo estudo, a co-infecção de PCV2 e PPV produziu doença clínica e lesões micro e macroscópicas em todos os animais inoculados, com abundante associação de antígenos de PCV2 e mínima associação de antígenos de PPV. Outro experimento utilizando leitões PIC e inoculação com PCV2 produziu doenças clínicas consistentes com SMDS (BOLIN et al., 2001).

#### 1.2.10.3. Leitões amamentados com colostro

Leitões soronegativos de 3-4 semanas de idade inoculados com PCV2 não demonstraram sinais clínicos da síndrome, apenas algumas poucas lesões

macroscópicas e lesões histológicas leves a moderadas (MAGAR et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos em leitões com 8 semanas de idade (BALASCH et al., 1999).

A inoculação de PCV2 em animais SPF soronegativos produziu doença clínica em 4 de 10 inoculados, sendo três animais do grupo que não foi imunoestimulado e um do grupo que foi imunoestimulado com KLH/AFI (LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002). Leitões de 8 a 9 semanas de idade inoculados com PCV2, com ou sem adjuvante (Montanide 888, Simusol 5100 e Marcol 52), apresentaram hipertermia, mas nenhum apresentou outro sinal clínico ou lesões micro e macroscópicas, indicando que a imunoestimulação com adjuvantes comerciais não conseguiu reproduzir a síndrome (RESENDES et al., 2004b).

#### 1.2.11. Considerações finais sobre a SMDS

Segundo Darwich et al. (2004) é geralmente aceito que:

- A doença aparece em suínos desmamados ou na fase inicial de terminação;
- Somente 10-30% dos suínos naturalmente infectados desenvolvem a SMDS;
- A característica mais proeminente da doença é depleção linfóide generalizada afetando órgãos linfóides primários e secundários, assim como a circulação de linfócitos.

- Infecções experimentais com PCV2 podem reproduzir a SMDS, porém quando ocorre a co-infecção com PRRSV e PPV a doença é mais grave.

- Suínos com SMDS têm padrões alterados de mRNAs que expressam citocinas em vários tecidos linfóides e a produção de citocinas pelos PBMC é reduzida.

### **1.3. Outras manifestações clínicas associadas ao PCV2**

#### 1.3.1. Síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos

Descrita pela primeira vez no Reino Unido (SMITH et al., 1993), esta enfermidade é freqüentemente fatal, afetando principalmente suínos de 6 a 16 semanas de idade (SMITH et al., 1993; THIBAUT et al., 1998). Animais acometidos

apresentam lesões cutâneas derivadas de uma vasculite necrotizante grave que afeta a derme e o tecido subcutâneo, caracterizada por uma inflamação nos vasos sanguíneos, acompanhada por necrose epidermal, ulceração e hemorragia da derme (DURAN et al., 1997; SMITH et al., 1993; THIBAUT et al., 1998). O rim encontra-se com volume aumentado, com múltiplos focos hemorrágicos na região cortical e os linfonodos renais e inguinais estão frequentemente aumentados e hemorrágicos (RAMOS-VARA et al., 1997).

O papel do PCV2 na patogenia da síndrome ainda não foi completamente esclarecido. Porém, DNA e antígenos virais foram detectados em tecidos de animais com SDNS (ALLAN et al., 2000a; CHOI e CHAE 2001), o que sugere o envolvimento do agente com a síndrome, apesar do vírus não ter sido detectado em todos os casos (ROSELL et al., 2000). Wellenberg et al. (2004) em estudo de caso-controle da SDNS demonstraram que os níveis de anticorpos contra PCV2 foram significativamente maiores nos casos do que nos controles, sugerindo que o excesso de anticorpos contra PCV2 poderia desencadear o desenvolvimento da síndrome através da deposição de imunocomplexos. Todavia, evidências sugerem que outros patógenos como *Pasteurella multocida* (LAISON et al., 2002; THOMSON et al., 2001) ou a combinação de patógenos como PCV2 e PRRSV (CHOI e CHAE; 2001; ROSELL et al., 2000; THIBAUT et al., 1998) podem induzir a SDNS.

### 1.3.2. Complexo das doenças respiratórias dos suínos

Caracterizada por tosse, dispnéia, piroxia, anorexia e letargia, esta síndrome afeta animais de 16-22 semanas que apresentam crescimento lento e baixa eficiência na conversão alimentar (THACKER, 2001). Os patógenos mais frequentemente envolvidos no Complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) são o PRRSV e o *Mycoplasma hyopneumoniae*, embora outras bactérias e vírus também tenham sido detectados em surtos de CDRS, dentre eles o PCV2 (THACKER e THACKER, 2000). A identificação do PCV2 em alguns casos de pneumonia necrotizante proliferativa levou alguns autores a sugerirem que o PCV2 poderia ter uma importante contribuição no complexo (ELLIS et al., 1999a).

### 1.3.3. Falhas reprodutivas

Existem vários casos de falhas reprodutivas associadas ao PCV2, tais como, elevação de da taxa de aborto, natimortos e mumificação fetal (JOSEPHSON e CHARBONNEAU, 2001; KIM et al., 2004; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001; WEST et al., 1999). Em um estudo experimental a inoculação fetal com PCV2 resultou em natimortos, mumificação fetal parcial e recém-nascidos com baixo desenvolvimento junto com leitões clinicamente saudáveis (JOHNSON et al., 2002).

O tropismo celular do PCV2 parece mudar com a idade do suíno. Fetos infectados *in utero* aos 57, 75 e 92 dias de gestação tiveram diferentes distribuições do vírus no tecido. Fetos inoculados aos 57 dias tinham elevada quantidade de vírus em cardiomiócitos e, em menor escala, em macrófagos e hepatócitos. Na fase final da gestação ou após o nascimento, o vírus foi encontrado principalmente em macrófagos e era escasso em outros tecidos (SÁNCHEZ et al., 2003).

### 1.3.4. Tremor congênito

O tremor congênito suíno (TCS) ou mioclonia congênita é caracterizado por tremores da cabeça e dos membros em recém nascidos. Dois tipos de TCS têm sido descritos com base na deficiência (tipo A) ou não (tipo B) de mielina no sistema nervoso central e periférico (SEGALÉS et al. 2004). Em adição, o TCS tipo A tem sido subdividido em 5 subtipos diferentes (AI-AV), associados a anormalidades genéticas, intoxicação por triclorfon em fase intra-uterina e infecção uterina por alguns vírus. O TCS subtipo AII é a forma mais comum de tremores congênitos e é caracterizado por contrações clônicas com graus de severidade variado, mas que diminuem ou cessam a partir da quarta semana de idade. A associação do PCV2 com tremores congênitos é controversa. Stevenson et al. (2001) utilizando hibridização *in situ*, imunofluorescência indireta e PCR, demonstraram a presença de ácido nucléico e antígenos de PCV2 no cérebro e medula espinhal. Porém, Kennedy et al. (2003) não confirmam essa ligação do PCV2 com tremores congênitos em suínos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

- Sequenciar amostras de PCV2 isoladas no RS;
- Avaliar métodos para produção de antígenos visando o futuro desenvolvimento de uma vacina.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Utilizar a técnica de ACRMP para amplificação do genoma do PCV2;
- Comparar as seqüências de PCV2 obtidas com outras disponíveis do Brasil e outros países;
- Produzir um clone viral a partir dos genomas isolados;
- Propagar os clones virais de PCV2 através da criação de uma linhagem persistentemente infectada.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **3.1. Rolling circle amplification of genomes of Brazilian circovirus type 2 (PCV2) and propagation of recombinant PCV2**

Trabalho em preparação



Rolling circle amplification of genomes of Brazilian circovirus type 2 (PCV2) and propagation of recombinant PCV2

D. Dezen<sup>a</sup>, F.A.M. Rijsewijk<sup>b</sup>, A.C. Franco<sup>b</sup>, F. Campos<sup>b</sup>, T.F. Teixeira<sup>a</sup>, C.L. Holz<sup>a</sup>, S. Caixeta<sup>a</sup>, S.P. Cibulski<sup>a</sup>, AP Oliveira<sup>a</sup>, O. Dellagostin<sup>c</sup>, P.M. Roehé<sup>a,b,#</sup>

*<sup>a</sup>Laboratório de Virologia, FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF), Caixa Postal 47, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil. <sup>b</sup>Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil <sup>c</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil*

# Corresponding author.

Tel.: +55 514813711; fax: +55 514813711; E-mail [proehe@adufrgs.ufrgs.br](mailto:proehe@adufrgs.ufrgs.br)

**Abstract**

Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections affect the pig industry worldwide and form a still growing problem in Brazil. To study the PCV2 viruses isolated from infected pigs in Rio Grande do Sul, Brazil, and to obtain an infectious copy of PCV2, rolling-circle replication using Phi29 DNA polymerase was used to amplify genomic PCV2 DNA. Total DNA from PCV2 infected tissue from pigs suffering postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) was used as a template for Phi29 DNA polymerase and the obtained PCV2 genomes were cloned into prokaryotic plasmid pCR2.1. Two cloned versions of PCV2 genomes from the same outbreak of PMWS were obtained and sequenced. The nucleotide sequences (1,767 nt) of the two PCV2 isolates were identical except for one silent substitution in the capsid coding region and both showed very little difference to the nucleotide sequences of other PCV2 viruses isolated elsewhere in the world.

To check whether the PCV2 genomes can be used to develop a live attenuated recombinant vaccine, one of the cloned PCV2 genomes was transfected into swine testicular (ST) cells. The supernatants of the transfected ST cells contained infectious recombinant PCV2. Interestingly, cotransfection of PCV2 DNA with a plasmid with a neomycin gene blocked the appearance of geneticin resistant colonies.

Key words: porcine circovirus type 2, PMWS, rolling-circle amplification, infectious copy, swine.

## Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the major infectious agent involved in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), a worldwide emerging swine disease described at the early 1990s (Segales et al., 2005). PCV2 infections form a still growing problem for the pig industry in Brazil (Castro et al., 2004, Corrêa et al., 2006).

A PCV2 virion has a non-enveloped capsid with icosahedral symmetry and a diameter of 17 nm. The genome of PCV2 is a covalently closed single-stranded circular DNA (ssDNA) molecule of about 1.77 kb (Mankertz et al., 2004). PCV2 is classified in the genus *Circovirus* of the *Circoviridae* family, together with circoviruses found in birds (Pringle, 1999). PCV2 is highly related to the non-pathogenic virus PCV1 (68 to 76% sequence homology), which was discovered in 1974 as a contaminant of porcine kidney cells (PK15) (Tischer et al., 1974). In the host cell, the circular ssDNA genome of circoviruses is converted into a double-stranded DNA (dsDNA) replicative intermediate. This dsDNA intermediate serves as a template for replication by a rolling-circle replication (RCR) mechanism (Mankertz et al., 2004; Steinfeldt et al., 2006). The virus encoded Rep and Rep' proteins are essential for this RCR mechanism, together with an unknown DNA polymerase, presumably of the host origin.

The major protein coding regions presently recognized in the PCV2 genome are ORF1, coding the Rep and Rep' proteins, and ORF2, which codes for capsid protein Cap. *In silico* analysis of PCV2 nucleotide sequences showed that most PCV2 isolates have at least 5 more possible ORFs, coding proteins of more than 5 kDa. The protein coded for one of these, ORF3, has been demonstrated and its role in apoptosis and as a virulence factor has been established (Liu et al., 2005 & 2006). Other features of the PCV2 genome that are worth mentioned, are the CpG-N sequences that can block innate immune responses such as the production of interferon type 1 (Vincent et al., 2007).

Various recombinant vaccines against PCV2 are under development: a) DNA vaccines based on eukaryotic expression vectors expressing the PCV2 Cap protein (Blanchard *et al.*, 2003; Kamstrup *et al.*, 2004), b) Subunit vaccines based on the Cap protein produced by the baculovirus system (Blanchard *et al.*, 2003) and c) vector vaccines expressing the Cap gene or both the Rep and the Cap genes. The vector is either the non-virulent PCV1 (Fenaux et al., 2004), pseudorabies virus (Ju et al., 2005; Song et al.,

2007) or adenovirus (Wang et al., 2006). Unfortunately, the clinical signs supposed to be caused by PCV2 in the field are difficult to reproduce under experimental conditions. Consequently, the efficacy of candidate vaccines can not be established adequately.

The work presented here concerns the rolling-circle replication of genomic PCV2 DNA using Phi29 DNA polymerase (Dean et al., 2001), cloning and sequencing of dsDNA forms of genomes of PCV2 strains affecting the pig population of Rio Grande do Sul, Brazil and the propagation of recombinant PCV2. This recombinant PCV2 may be helpful to study the virulence factors of PCV2 and to develop a live attenuated recombinant PCV2 vaccine.

## **Materials and Methods**

### *Tissue samples*

Two 7-12 weeks old pigs from a commercial herds in Rio Grande do Sul, Brazil, showing clinical signs of PMWS, such as progressive weight loss, dyspnoea, enlargement of superficial inguinal lymph nodes, pallor, jaundice and diarrhoea were subjected to necropsy. Tissue samples from kidney, liver, lung, mesenteric lymph nodes and spleen were collected and stored at -80°C until used.

### *DNA extraction and PCV2 PCR*

Ten mg of tissue was digested for four hours at 37°C in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.01% SDS and 1 mg/ml proteinase K) and the DNA was extracted as described previously (Van Engelenburg et al., 1993). One hundred ng of total DNA of each sample was used to perform a PCV2 PCR using the method of Kim et al. (2001).

### *Rolling-circle amplification (MPRCA)*

The samples of each tissue were used to perform a multiple-primed rolling circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes. The modified MPRCA protocol of Niel et al. (2005) was carried out in 25 µl, using 250 ng of total DNA. The DNA was heated at 95°C for 3 min, placed on ice and afterwards the premix was added. The premix was prepared with 2 U of phi29 DNA Polymerase (New England Biolabs), 2.5 µl of 10 x phi29 DNA Polymerase buffer (New England Biolabs), 0.2 mg/ml of BSA (New

England Biolabs), 25  $\mu$ M of exonuclease-resistant random primer (Fermentas Life Sciences) and 1mM of each dNTP (Amersham Biosciences). The reactions were incubated for 18h at 30°C and were then heated to 65°C for 10 min to inactivate the phi29 DNA polymerase.

#### *Cloning of PCV2 genome in prokaryotic vector*

The obtained MPRCA products were digested with *EcoRI* and the obtained fragments were separated on a 0.7% agarose gel with ethidium bromide. Samples with a clear product of a unique length of a PCV2 genome (1.77 kb) were cloned into the *EcoRI* site of pCR2.1 using TOP10 *E. coli* cells.

#### *Nucleotide sequence analysis*

Isolated plasmid DNA was purified using the GFX™ Purification Kit (Amersham Biosciences) and the PCV2 inserts were fully sequenced, each strand was sequenced in MegaBACE at least four times using the primers described in Table 1 and the Dyanamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences).

#### *Phylogenetic analyses*

The obtained sequences were assembled in the SeqMan program (DNASTAR Inc) and only the sequences that had at least 4 high quality nucleotide assignments on each strand were accepted. The obtained sequences were aligned with a set of PCV2 genome sequences (plus 1 PCV1 sequence) from the NCBI data base using the ClustalW method of the MegaAling program (DNASTAR Inc). The parameters used were Gap Penalty 10, Gap Length Penalty 0.20, Delay Divergence Seqs(%) 30 and DNA Transition Weight 0.50. A phylogenetic tree was constructed using neighbor joining method and 1.000 bootstrap.

#### *Cells*

Swine testicular (ST) cells (ATCC CRL-1746) were grown in MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Soralis), non-essential amino acids, glutamine and penicillin (Gibco).

#### *Transfection and selection*

Two times  $10^5$  ST cells per well/six-well cluster were transfected with either about 1  $\mu\text{g}$  recircularized PCV2 DNA or 1  $\mu\text{g}$  pCDNA3 plasmid encoding the neomycin/geneticin resistance gene or with both using 12  $\mu\text{l}$  lipofectamine (Invitrogen)/well. One day after the transfection the cells in the wells that had to be selected with Geneticin (Gibco Inc.) were passaged 1 to 10. Two days after the transfection the supernatants of the remaining wells were collected and the monolayers were stained to detect the expression of PCV2-Cap protein. Three weeks after transfection the colonies that survived the Geneticin selection were also stained to detect the presence of PCV2 Cap protein.

#### *Immunological staining*

The immunostaining was performed essentially according to the method as described by Kramps et al. (1994). In short: cells were fixed using cold 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times with PBS and incubated with rabbit anti-PCV2-Cap polyclonal serum. After 1 hour at 37°C the wells were washed with PBS-0.05% Tween-80 and incubated with anti-rabbit immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (Zymed) for 1 hour at 37°C. After another round of washing with PBS-Tween-80, sodium acetate buffer pH 5.0 with 5% 3-amino-9-ethylcarbazole solution was added in the presence of 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## **Results**

#### *PCV2 PCR positive samples*

The total DNA, extracted from the tissue samples from pigs with clinical signs of PMWS, was quantified and 0.1  $\mu\text{g}$  total DNA was used in a PCR analysis performed according to the method of Kim et al. (2001). This PCR analysis has a sensitivity of about 20 copies per 25  $\mu\text{l}$  reaction. The results of the PCR were summarized in the Table 2.

#### *Multiple primed rolling circle amplification (MPRCA)*

From the ten PCV2 positive DNA samples that were used to do the MPRCA, two samples from kidney and one from lung out of ten samples tested showed a clear amplification of the input material (Table 2). Due to the rolling circle amplification, a whole range of large concatameric molecules were produced, containing a variable number of the PCV2 genomes. These products form on a 1% agarose gel a smear from

about 2 kb upwards. The identification of this smear as the product of the rolling circle amplification of PCV2 genomes was done by restriction enzyme analysis. Enzymes, like *EcoRI*, that cut the PCV2 genome only once, give rise to a well discernable band of the unit length of the PCV2 genome of 1.77 kb (Fig. 1).

#### *Cloning and sequencing*

To identify the MPRCA products further, three 1.77 kb *EcoRI* fragments were isolated and cloned into the prokaryotic vector pCR2.1. As two samples originated from the same animal, only numbers 15/23R and 15/5P, which originated from the same farm but from different animals, were subjected to nucleotide sequence analysis. Both sequences are 1767 nt long and differ only at nucleotide number 1603 (NCBI accession numbers are DQ923523 and DQ923524 for isolates 15/5P and 15/23R respectively). Isolate 15/5P has a guanine residue on position 1603, where isolate 15/23R has thymine residue. The guanine residue is very common, while the thymine was never found before among the presently 243 PCV2 sequences in the NCBI database. Nucleotide 1603 is located in the ORF2 region that codes for the Cap protein, but the thymidine at that position does not change its amino acid sequence. It does however change the amino acids sequences encoded by the other reading frames, but no protein encoded by the other frames has been identified yet. The five most closely related PCV2 sequences are: The French PCV2 strain Fd7 (AY321990), with only two nucleotide differences from isolate 15/5P, the Dutch PCV2 isolates NL\_PMWS\_3, NL\_PMWS\_4, NL\_Control\_3, (AY484415, AY484416 and AY484409) with each three nucleotide differences from isolate 15/5P and the French PCV2 isolate Fd1 (AY322000), also with three nucleotide differences from 15/5P. The least related of the presently published PCV2 isolates is the USA isolate PMWS-PCV-P3 (AY099497) with 81 nucleotide differences compared to 15/5P. The PCV1 sequence with the highest homology to isolate 15/5P has 73% identity. The only other Brazilian isolate in the NCBI data base (DQ364650) that was isolated in the Minas Gerais state shows 14 nucleotide differences with isolate 15/5P and has a genome length of 1768 instead of 1767 nucleotides.

#### *Transfection and selection*

The cloned PCV2 genome 15/23P was used for the transfection studies. The 1.7 kb *EcoRI* fragment was isolated from the plasmid and recircularized. Generally three bands appear after recircularization: a band that comigrates with the linear form and that

presumably is not ligated and one faster and one slower migrated band that only appear after ligation (Fig. 2). The identity of each band is presently not known. The mixture of bands was used for the transfection of cloned PCV2 DNA into ST cells.

Two days after the transfection immunostaining with anti-PCV2 Cap antisera showed a large number of positive cells (Fig. 3), indicating that the gene *cap* is expressed. As the *Eco*RI site is located at nt 1420, which is in the middle of the Cap encoding region (nt 1733 - nt 1033), the recircularized PCV2 DNA is most likely used as a template.

In an attempt to obtain a constitutively PCV2 producing cell line, part of the transfected cells were selected with Geneticin. Three weeks after transfection in each well of the six well cluster some 4 - 6 large (3 mm diameter) colonies of ST cells that were transfected with only pCDNA3 were found, while in the ST cells that also received 1 $\mu$ g of PCV2 DNA no colonies were found. After closer inspection of the pCDNA3/PCV2 plates, only very small groups of hardly growing and separated cells could be observed. A small number of these 'sick' cells were positive for the PCV2 Cap protein. When the amount of PCV2 DNA has been decreased the number of resistant colonies increased (Fig. 4)

#### *Infectious recombinant PCV2*

To determine whether the recircularized PCV2 DNA could give rise to infectious PCV2 virus, the supernatant of the ST cells transfected with recircularized PCV2 DNA was collected at day 2 post transfection and transferred to a fresh monolayer of ST cells. Three days after infection of the new monolayer immunostaining showed groups of PCV2 positive cells, proving the presence of infectious PCV2 virus in the supernatant of the infected cells.

#### **Discussion**

There is a still growing number of cases of porcine circovirus diseases in Brazil. The isolation and genomic characterization two PCV2 isolates of the Brazilian state Rio Grande do Sul confirms the previous pathological and serological findings (Corrêa et al., 2006).



The quality of the nucleotide sequences of the two PCV2 clones described here was high and the obtained sequences did not show unexpected mutations. However, the thymine residue on position 1603 of isolate 15/23P is not found in any of the 243 presently known PCV2 sequences. This may still be a trustable observation in the sense that a thymine residue really occurred on position 1603 of a PCV2 genome, but an artefact can not be excluded. The polymerase phi 29 used in this study has a proof reading activity and so have the *E. coli* polymerases that replicated the recombinant plasmid making it unlikely that the sequence is an error due to the isolation method. It may, however, also be that among the PCV2 viruses found in a host, genetic variants are present that are less common or even less viable and hence less frequently observed. The size of the genomes of isolates 15/5P and 15/23R (1767 nt) places them in PCV2 group 1 (Fig. 5) (Olvera et al., 2007) and their close relationship with the French PCV2 isolates Fd1 and Fd7 (AY321990 and AY322000) and the Dutch PCV2 isolates NL\_PMWS\_3, NL\_PMWS\_4, NL\_Control\_3 (AY484415, AY484416 and AY484409) places them in cluster 1A (Olvera et al., 2007). This cluster is characterized by genomes that entered the NCBI data base after 2003 and has mainly China, France and the Netherlands as countries of origin (Olvera et al., 2007). The 1A genomes belong to viruses from both animals with PMWS and healthy carriers. This may suggest that the PCV2 found in Rio Grande do Sul originates from a healthy carrier from one of the above mentioned countries, but such a suggestion would be too early since the available sequence information is far from representative. The 16 nt differences and genome length difference between the isolates from Rio Grande do Sul described here and the genome of a PCV2 isolate from the Minas Gerais state (DQ364650) points away from a common origin for the PCV2 viruses found in these different states of Brazil.

The propagation of recombinant PCV2 is the first step in the development of a recombinant PCV2 vaccine. The infectivity of supernatants of ST cells transfected with recircularized PCV2 DNA shows that the recombinant is viable. However, the PCV2 titres in this supernatant are still far too low for a vaccine strain. This may be solved by using other method to grow the virus, although titres above  $10^6$  are seldom reported. This stimulated us to try to get a constitutively PCV2 expressing cell line. The first attempt, however, showed that PCV2 has a negative effect on the Geneticin resistant colony formation of ST cells. This could be due to the expression of the ORF3 protein that induces apoptosis or to the induction of antiviral cytokines like interferon type 1, or

both. Other mechanisms can also not be excluded, like the toxic effect of high copy numbers of PCV2 genomes. One remarkable observation is that not all cells that have growth problems after cotransfection of PCV2 with pCDNA3 are positive for PCV2 Cap protein. This suggest that either the genome itself is toxic or that a small number of PCV2 positive cells are expressing sufficient antiviral cytokines to block the growth of the neighbouring cells as well.

In future experiments various options will be addressed, like the cotransfection of a PCV2 ORF3 negative mutant, the use of ST cells that are made less sensitive for interferon and the use of smaller amounts of PCV2 DNA.

### **Acknowledgements**

We thank to Dr. David Driemeier, from Veterinary College of Federal University of Rio Grande do Sul, for the swine samples. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). D. Dezen received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **References**

Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A., 2003. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21, 4565-4575.

Castro, A.M., Cortez, A., Ruiz, V.L., Leomil, H., Moreno, A.M., Doto, D.S., Richtzenhain, L.J., 2004. Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet. Rec.* 154, 728-729.

Corrêa, A.M.R., Pescador, C.A., Schmitz, M., Zlotowski, P., Rozza, D.B., Oliveira, E.C., Barcellos, D.E., Driemeier, D., 2006. Clinical and pathological aspects of swine circovirus in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 26, 9-13.

Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., Lasken, R.S., 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 11, 1095-1099.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. 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. *J. Virol.* 78, 6297-303.

Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B., Chen, H., 2005. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 109, 179-90.

Kim, J., Han, D.U., Choi, C., Chae, C., 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 98, 25–31.

Kramps, J.A., Magdalena, J., Quak, J., Weerdmeester, K., Kaashoek, M.J, Maris-Veldhuis, M.A., Rijsewijk, F.A., Keil, G., van Oirschot, J.T., 1994. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.* 32:2175-2181.

Liu, J., Chen, I., Kwang, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol.* 79, 8262–8274.

Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis *in vivo*. *J. Virol.* 80, 5065–5073.

Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Botner, A., 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358-1361.

Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch T. 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet. Microbiol.* 98, 81–88.

Niel, C., Diniz-Mendes, L., Devalle, S., 2005. Rolling-circle amplification of torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J. Gen. Virol.* 86, 1343-1347.

Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175-85.

Pringle, C.R., 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch. Virol.* 144, 2065-2070.

Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6,119-142.

Song, Y., Jin, M., Zhang, S., Xu, X., Xiao, S., Cao, S., Chen, H., 2007. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 119, 97-104

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2006. Demonstration of nicking/joining activity at the origin of dna replication associated with the Rep and Rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 80, 6225–6234.

Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriologie* 226, 153-67.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular singlestranded DNA. *Nature* 295, 64-66.

Van Engelenburg F.A.C., Maes, R.K., Van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A.M. 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microb.* 31, 3129-3135.

Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunol.* 120, 47-56.

Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z., Xu., J., 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* 24, 3374-80.

*Tables*

Table 1  
 Oligonucleotide primers used for sequencing PCV2 genomes fully cloned in pCR2.1.

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
1F	ACCAGCGCACTTCGGCAG
418F	TGAGTACCTTGTTGGAGAGC
1095F	CGGATATTGTAGTCCTGGTCG
1286F	GTAATCCTCCGATAGAGAGC
433R	TCCAACAAGGTACTIONCACAGCAG
886R	GTAATCCTCCGATAGAGAGC
1696R	GGTGTCTTCTTCTGCGGTAACG
1768R	AATACTTACAGCGCACTTCTTTTCG
1549R	ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

Table 2

Detection of PCV2 in tissue samples using PCR and MPRCA. The positive signs refer to the intensity of the obtained bands classified as negative (-) weak (+), intermediate (++) and strong (+++).

<b>Animal</b>	<b>Tissue</b>	<b>PCR</b>	<b>MPRCA</b>
15/5	Kidney	++	-
	Liver	++	-
	Lung	+++	++
	Lymphnodes	++	-
	Spleen	++	++
15/23	Kidney	+++	-
	Liver	++	-
	Lung	+++	++
	Lymphnodes	++	-
	Spleen	++	-

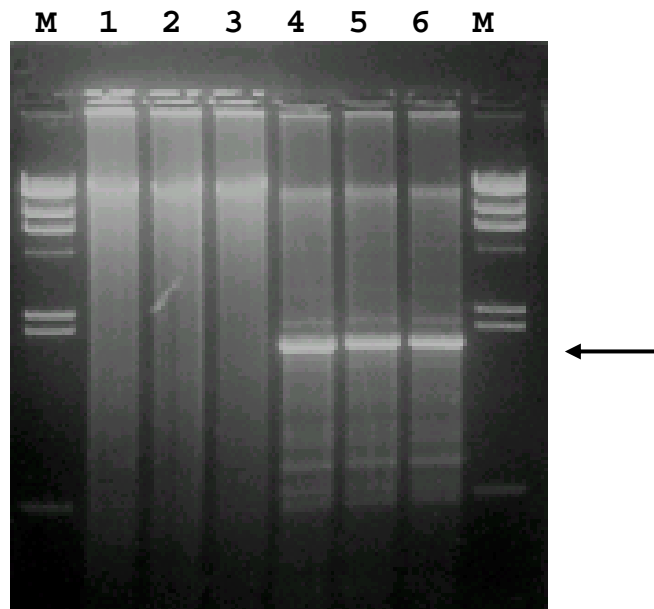
*Figures*

Fig. 1. 0.7% Agarose gel electrophoresis of products of MPRCA reactions of the three positive tissues shown in Table 1. M: Lambda x *Hind*III ladder, lanes 1 to 3: undigested products of samples 15/5R, 15/5P and 15/23R, respectively; lanes 4 to 6: digested products with *Eco*RI of samples 15/5R, 15/5P and 15/23R, respectively. The arrow points to the 1.7 kb fragment, which was cloned.



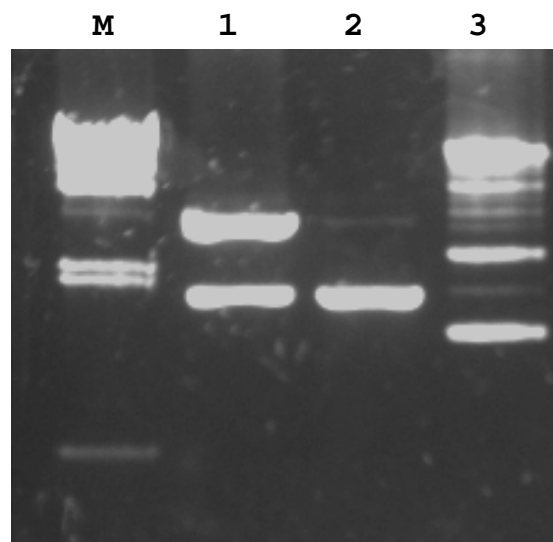


Fig. 2. 0,7% agarose gel showing cloned, linearized and recircularized PCV2 DNA of isolate 15/23R. Lambda x *Hind*III Ladder (M). PCV2 genome cloned into pCR2.1 vector and digested with *Eco*RI (1). *Eco*RI linearized genome (2). T4 ligase recircularized PCV2 genome.

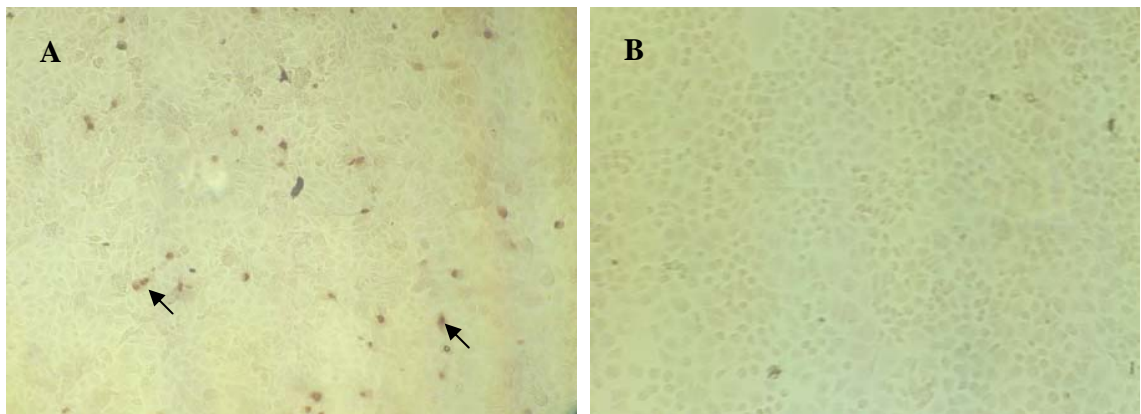


Figure 3 – Immunoperoxidase of monolayer ST cells using anti-Cap PCV2 polyclonal antibody. Transfected ST cells (A) showing several PCV2-positive cells of which two are indicated by arrows and non- transfected ST cells (B).

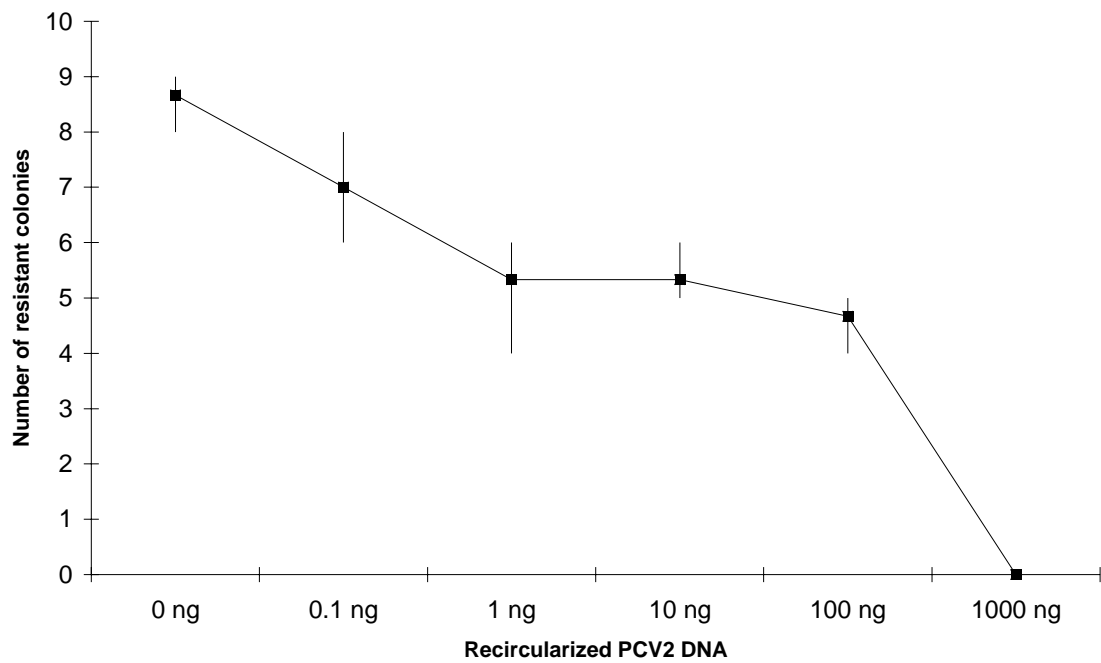


Figure 4- Number of Geneticin-resistant of ST cell colonies and relationship with the amount of recircularized PCV2 DNA cotransfected with 1 ng of pCDNA3. The squares refers to the mean values (n =3). Vertical lines refer to the standard deviations.

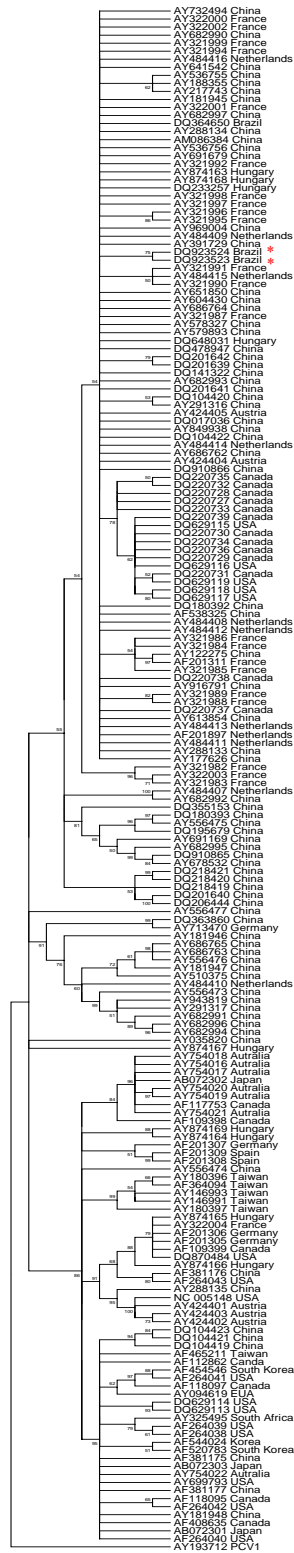


Figure 5 – Phylogenetic tree showing relationship among the two Brazilian PCV2 genomes isolated in this study (asterisks), 243 PCV2 and one PCV1 genome sequences. The tree was constructed using neighbor joining method and 1,000 bootstraps.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo, utilizou-se a ACRMP, pois esta técnica amplifica todo o genoma do PCV2 com relativa facilidade, o que permite seu seqüenciamento na íntegra e obtenção de clones infecciosos, o que com a PCR não é tão direto. Este é primeiro relato do uso da ACRMP na amplificação de PCV2. Anteriormente a ACRMP havia sido descrita para a amplificação de outros genomas virais, como begomovírus (INOUE-NAGATA et al., 2004), papilomavírus (RECTOR et al., 2004), torque teno vírus (NIEL et al., 2005), poliomavírus (JOHNE et al., 2006a) e um novo circovírus encontrado em *Sturnus vulgaris* (JOHNE et al., 2006b).

A ACRMP amplifica DNAs circulares (DEAN et al., 2001) e lineares (PAEZ et al., 2004), utilizando oligonucleotídeos randômicos, não sendo necessário o conhecimento prévio das seqüências a serem amplificadas. Portanto, o uso da ACRMP, poderia futuramente ser aplicado na pesquisa e caracterização de outros agentes que poderiam ter algum envolvimento na síndrome, como o PPV (KRAKOWKA et al., 2000) ou outros agentes associados a outras patologias. Outra vantagem do uso da ACRMP é que as reações são submetidas à temperatura constante de 30°C (DEAN et al., 2001), o que elimina a necessidade de termocicladores e contribui para que estas técnicas de amplificação “a frio” venham a ser cada vez mais empregadas.

Além disto, esta técnica produz seqüências confiáveis. A phi29 DNA polimerase, usada na ACRMP, possui atividade de *proof reading*, o que resulta numa taxa de erro de  $3 \times 10^{-6}$  a  $5 \times 10^{-6}$  (ESTEBAN et al., 1993; NELSON et al., 2002). Esta taxa de erro é aproximadamente 100 vezes menor que a da *Taq* polimerase utilizada na maioria dos PCRs (DUNNING et al., 1988) e comparável com DNA polimerases de alta fidelidade (CLINE et al., 1996).

A qualidade das seqüências de nucleotídeos dos clones foi alta e as seqüências obtidas não mostraram mutações inesperadas. Todavia, o resíduo de timina presente na posição 1603 do isolado 15/23P não foi encontrado em nenhuma das 243 seqüências conhecidas de PCV2. Isto pode ser uma observação confiável no sentido que o resíduo de timina realmente ocorre na posição 1603 do genoma do PCV2, mas a produção de artefatos não pode ser excluída. Todavia, é possível que entre os PCV2 encontrados no hospedeiro, algumas variantes genéticas sejam menos comuns e, conseqüentemente, menos observadas.

Seguindo os critérios propostos por Olvera et al. (2007), as seqüências 15/5P e 15/23R, devido ao tamanho genômico de 1767 nucleotídeos, foram classificadas no grupo 1 e, por apresentarem determinados nucleotídeos no gene *cap* e *rep*, foram agrupadas no “cluster” 1A. Este “cluster” é composto por amostras de origem chinesa, francesa e holandesa e possui amostras isoladas de animais saudáveis e clinicamente acometidos pela SMDS. Isto sugere que o PCV2 encontrado no estado do Rio Grande do Sul possa ter se originado de portadores saudáveis. Evidências contribuem para esta observação, haja vista que o PCV2 foi detectado em amostras brasileiras de tecidos parafinados a partir de 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006), enquanto que o primeiro relato de SMDS, no Brasil, só ocorreu em 2001 (CIACCI-ZANELLA et al., 2001). Embora encontrada alta identidade entre os isolados brasileiros, a diferença no tamanho genômico e em 16 nucleotídeos dos isolados do Rio Grande do Sul e do isolado de Minas Gerais (DQ364650) sugerem uma origem não comum dos PCV2 encontrados nestes estados.

Seguindo a transfecção, as células ST transfectadas com o DNA do PCV2 produziram partículas virais, porém no seu sobrenadante os títulos detectados mostraram-se baixos. Estudos anteriores mostraram que *in vitro* o PCV2 raramente chega a títulos de  $10^6$  (FENAUX et al., 2003) e geralmente o vírus é de difícil replicação, sendo necessária a utilização de glicosaminas para aumentar a presença de antígenos virais (TISCHER et al., 1987). Visando a futura produção de uma vacina, a propagação do vírus constitui uma etapa importante no desenvolvimento de imunógenos. Portanto, uma estratégia que vise a otimização da produção de massa antigênica, como a criação de uma linhagem celular persistentemente infectada com PCV2, seria uma alternativa frente a este problema.

Alguns autores descrevem a criação de linhagens persistentemente infectadas com o vírus da Hepatite C (IKEDA et al., 2005), vírus da Hepatite E (THAKRAL et al., 2005) e herpesvírus bovino tipo 4 (DONOFRIO et al., 2000), através da transfecção do gene de resistência ao geneticin associado ao genoma viral e posterior seleção de colônias celulares resistentes. Esta mesma estratégia foi utilizada neste estudo. Todavia, a primeira tentativa de produção de uma linhagem persistentemente infectada com PCV2 mostrou que o clone utilizado aparentemente induzia um efeito negativo na formação de colônias resistentes ao geneticin. Isto pode estar relacionado à expressão da proteína da ORF3, a qual induz apoptose (LIU et al., 2005) ou à indução de citocinas antivirais, como os interferons (IFN), uma vez que a replicação do PCV2 é influenciada

pelas mesmas (MEERTS et al., 2005b). Outros mecanismos não podem ser excluídos, como efeito tóxico do alto número de cópias de genomas de PCV2. Em experimentos futuros poderão ser utilizadas opções como a cotransfecção com um mutante de PCV2 ORF3 negativo, assim como a produção de células menos sensíveis ao interferon e o uso de menores quantidades de DNA de PCV2.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; MCNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 11, p.17-26. 1994.
- ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; CASSDY, J.P.; REILLY, G.A.; ADAIR, B.; 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.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARK, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; MEEHAM, B.M.; ADAIR, B.M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p.3-10, 1998.
- ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease and death by co-infection of pigs with PCV2 and PPV. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1-11. 1999a.
- ALLAN, G.M.; McNEILLY, F., MEEHAN, B.M.; KENNEDY, S.; MACKIE, D.P.; ELLIS, J.A.; CLARK, E.G.; ESPUNA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BØTNER, A. CHARREYRE, C.E. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p.115-123. 1999b.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.M.; MOFFETT, D.; MALONE, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. PCV2 associated PDNS in Northern Ireland in 1990. **The Veterinary Record**, v. 146, p. 711-712. 2000a.
- ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.M.; ELLIS, J.A.; CONNOR, T.J., McNAIR, I.; KRAKOWKA, S.; KENNEDY, S. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 47, p. 81-94. 2000b.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 3-14. 2000.
- ALLAN, G.M., MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; BOTNER, A.; MCCULLOUGH, K.; NAUWYNCK, H.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; Charreyre, C. PMWS: experimental model and co-infection. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 165-168. 2004.
- BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 139-48. 1999.



- BLANCHARD, P.; MAHÉ, D.; CARIOLET, R.; KERANFLEC'H, A.; BAUDOARD, M.A.; CORDIOLI, P.; ALBINA, E.; JESTIN, A.; Protection of swine against postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. **Vaccine**, v. 21, p. 4565-4575. 2003.
- de BOISSESON, C.; BEVEN, V.; BIGARRE, L.; THIERY, R.; ROSE, N.; EVENO, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 293-304. 2004.
- BOLIN, S.R.; STOFFERGEN, W.C.; NAYAR, G.P.; HAMEL, A.L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 185-194. 2001.
- CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 41-49. 2004.
- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and disease. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 326-336. 2005.
- CHANG, H.W.; JENG, C.R.; LIN, T.L.; LIU, J.J.; CHIOU, M.T.; TSAI, Y.C.; CHIA, M.Y.; JAN, T.R.; PANG, V.F. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, p. 207-219. 2005.
- CHANG, H.W.; PANG, V.F.; CHEN, L.J.; CHIA, M.Y.; TSAI, Y.C.; JENG, C.R. Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 311-319. 2006.
- CHEUNG, A.K.; BOLIN, S.R. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. **Archives of Virology**, v. 147, p. 43-58. 2002.
- CHEUNG, A.K. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. **Virology**, v. 310, p. 41-49. 2003a.
- CHEUNG, A.K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 305, p. 168-180. 2003b.
- 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, C.; CHAE, C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 3 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labelling technique. **Veterinary Pathology**, v. 38, p.436-441. 2001.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnóstico da síndrome multisistêmica do debrinhamento do leitão desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo circovírus suíno tipo 2. **Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves**, v. 270, p.1-3. 2001.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1988 in Brazil. **Ciência Rural**, v. 26, p. 1480-1485. 2006.

CLINE, J.; BRAMAN, J. C.; HOGREFE, H.H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 3546–3551. 1996.

CORRÊA, A.M.R.; PESCADOR, C.A.; SCHIMITZ, M.; ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D.B.; OLIVEIRA, E.C.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 9-13. 2006.

CROWTHER, R.A.; BERRIMAN, J.A.; CURRAN, W.L.; ALLAN, G.M.; TODD, D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 13036-41. 2003.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in the CD4+, CD8+, CD4/CD8 double positive cells and IgM+ cell subsets in peripheral blood mononuclear cells from postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age matched uninfected wasted and healthy pigs, correlates with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 236-242. 2002.

DARWICH, L.; PIE, S.; ROVIRA, A.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; OSWALD, I.P.; MATEU, E. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2117-2125. 2003a.

DARWICH, L.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells of pigs suffering from postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 3453-3457. 2003b.

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

DEAN, F.B.; NELSON, J.R.; GESLER, T.L.; LASKEN, R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Genome Research**, v. 11, p.1095–1099. 2001.

DONOFRIO, G.; CAVIRANI, S.; van SANTEN, V.L. Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1807–1814. 2000.

DUNNING, A. M.; TALMUD, P.; HUMPHRIES, S.E. Errors in the polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p.10393. 1988.

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. **Journal of Swine Health and Production**, v. 5, p. 241-244. 1997.

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

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.; CLARK, E.; KENNEDY, S. The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus has expanded since 1897; an alternative perspective. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 262-265. 1999a.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAMORINE, M.; HAINS, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.M.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 3-14.1999b.

ELLIS, J.; CLARK, E.; HAINES, D.; WEST, K.; KRAKOWKA, S.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 159-163. 2004.

ESTEBAN, J. A.; SALAS, M.; BLANCO L. Fidelity of Phi29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 2719–2726. 1993.

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

FENEAUX, M.; OPRIENSSNIG, T.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weaning pigs. **Journal of Virology**, v. 77, p. 11232-11243. 2003.

FENAUX, M.; OPRIENSSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. **Journal of Virology**, v. 78, p. 6297-6303. 2004.

FITZGERALD-BOCARSLY, P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells precursors. **Biotechniques**, v.23 (Suppl.), p.24-29. 2002.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.E.; MORAES, N.; ZANELLA, J.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (Síndrome do Definhamento Multissistêmico de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 39-53. 2005.

GILPIN, D.F.; McULLOGH, K.; MEEHAN, B.M.; McNEILLY, F.; McFAIR, I.; STEVENSON, L.S.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. *In vitro* studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, p. 149-161. 2003.

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

GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; SANVIK, T.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; DREW, T.W.; BANKS, M. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. **Archives of Virology**, v. 149, p. 171-1183. 2004b.

GUILMOTO, H.; WESSEL-ROBERT, S. Control of PMWS in Brittany: a mainly zootechnical approach. In: PMWS: a new emerging disease of swine. Merial Symposium, new emerging disease of swine. Merial Symposium. **Anais...** Melbourne, Australia: Merial, 2002, p. 45-55.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 56, p. 313-329. 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, p. 5262-5267. 1998.

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

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

HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.R.; LAGER, K.M.; MOROZOV, I.; PAUL, O.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.

HASSLUNG, F.C.; BERG, M.; ALLAN, G.M.; MEEHAN, M.; McNEILLY, F.; FOSSUM, C. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN- $\alpha$  production by porcine PBMCs. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2937-2945. 2003.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p. 740-745. 2000.

IKEDA, M.; ABE, K.; DANSAKO, H.; NAKAMURA, T.; NAKA, K.; KATO, N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 1350–1359. 2005.

INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 209-211. 2004.

JOHNE, R.; WITTIG, W.; FERNÁNDEZ-DE-LUCO, D., HÖFLE, U.; MÜLLER, H. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. **Journal of Virology**, v. 80, p. 3523–3531. 2006a.

JOHNE, R.; FERNANDEZ-DE-LUCO, D.; HOFLE, U.; MULLER, H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 1189-1195. 2006.

JOHNSON, C.S.; JOO, H.S.; DIREKSIN, K.; YOON, K.J.; CHOI, Y.K. Experimental *in utero* inoculation of late-term seine fetuses with porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 507-512. 2002.

JOSEPHSON, G.; CHARBONNEAU, G. Case report of reproductive problems in a new startup operation. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, p. 258-259. 2001.

JU, C.; FAN, H.; TAN, Y.; LIU, Z.; XI, X.; CAO, S.; WU, B.; CHEN, H. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p.179-190. 2005.

KAMSTRUP, S.; BAEFOED, A.M.; FRIMANN, T.H.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; BOTNER, A. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. **Vaccine**, v. 22, p. 1358-1361. 2004.

KENNEDY, S.D.; 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.

KENNEDY, S.D.; SÉGALES, J.; ROVIRA, A.; SCHOLES, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 151-156. 2003.

KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 98, p. 25-31. 2001.

KIM, J.H.; LYOO, Y.S. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. **Journal of Veterinary Science**, v. 3, p. 31-39. 2002.

KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology** 128:52-59. 2003.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence and detection of porcine circovirus 2 in aborted and stillborn piglets. **The Veterinary Record**, v. 155, p. 114-115. 2004.

KIM, J.; CHAE, C. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein 1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, p. 121-126. 2004.

KIPEL, M.; STEVENSON, G.W.; GALBREATH, E.J.; NORTH, A.; HOGENESCH, H.; MITTAL, S.K. Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. **BMC Veterinary Research**, v.1, p.1-8. 2005.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.M. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of PMWS in gnotobiotic swine by co-infection with PCV2 and PPV. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 254-263. 2000.

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.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; McNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; McCULLOUGH, K.; ALLAN, G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. **Viral Immunology**, v. 15, p. 373-384. 2002.

KRIEG, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annual Reviews in Immunology**, v. 20, p. 709-760. 2002.

KYRIAKIS, S.C.; SAOULIDIS, K.; LEKKAS, S.; MILIOTIS, C.C.; PAPOUTSIS, P.A.; KENNEDY, S. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 38-46. 2002.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STORGAARD, T.; BOTNER, A.; ALLAN, G.; McNEILLY, F. Transplacental infections with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. **The Veterinary Record**, v. 148, p. 759-760. 2001.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology** 89:97-114. 2002.

LAISON, 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.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4629-4632. 2000.

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

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

LEKCHAROENSUK, P.; MOZORO, I.; PAUL, O.S.; THANGTHUMNIYOM, N.; WAJJAWALKU, W.; MENG, X.J. Epitope mapping of the major capsid protein of porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2 **Journal of Virology**, v. 78, p. 8135-8145. 2004.

LIU, Q.; WANG, L.; WILSON, P.; BAIUK, A. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3474-3477. 2000.

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

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 3 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, p. 5065-5073. 2006.

MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of PCV2 in weaned pigs: a sequential study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, p. 258-269. 2000.

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

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 in Spain, Germany and France. **Virus Research**, v. 66, p. 65-67. 2000.

MANKERTZ, A.; HILLENBRAND, B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral *rep* gene. **Virology**, v. 279, p. 2743-2751. 2001.

MANKERTZ, A.; HILLENBRAND, B. Analyses of transcription of porcine circovirus type 1 **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2743-2751. 2003.

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

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

McNULTY, M.S. **Electron micrographs of animal viruses – porcine circovirus**. Disponível em: <<http://www.qub.ac.uk/afs/vs/vsd9.jpg>> Acesso em: 21 dez. 2006.

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

MEEHAN, B.M.; McNELLY, F.; MCNAIR, I.; WALKER, I.; ELLIS, J.A.; KRAKOWA, S.; ALLAN, G.M. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and nephropathy syndrome. **Archives of Virology**, v.146, p. 835-842. 2001.

MEERTS, P.; MISINKO, G.; McNEILLY, F.; NAUWYNCK, H.J. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15, fetal cardiomyocytes and macrophages. **Archives of Virology**, v. 150, p. 427-441. 2005a.



MEERTS, P.; MISINKO, G.; NAUWYNCK, H. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cells lines by IFN- $\gamma$  before and after treatment and by IFN- $\alpha$  after treatment. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 25, p. 684-693. 2005b.

MEERTS, P.; MISINKO, G.; LEFEVRE, D.; NIELSEN, J.; BOTNER, A.; KRISTENSEN, C.S.; NAUWYNCK, H.J. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus development of PCV2-associated disease. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p.1-11, 2006.

MISINZO, G.; MERTZ, P.; BUBLOT, M.; MAST, J.; WEINGARTL, H.M.; NAUWYNCK, H.J. Binding entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of porcine monocytic line 3D1/31. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2057-2068. 2005.

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

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, p. 2535–2541. 1998.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, P.A.; SORDEN, S.D. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein **Journal of General Virology**, v., 81, p. 2281-2287. 2000.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.; 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 (ORF2)-based Enzyme-Linked immunosorbent assay for detection of antibodies to PCV. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 33-40. 2002.

NELSON, J.R.; CAI, Y.C.; GIESLER, T.L; FARCHAUS, J.W.; SUNDARAM, S.T.; ORTIZ-RIVERA, M.; HOSTA, L.P.; HEWITT, P.L.; MAMONE, J.A., ALANIAPPAN, C.; FULLER, C. W. 2002. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. **Biotechniques**, Suppl., p. 44–47. 2002.

NIEL, C.; DINIZ-MENDES, L.; DEVALLE, S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTVgenogroup. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1343–1347. 2005.

NIELSEN, J.; VINCENT, I.E.; BOTNER, A.; LADKJAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.C. Association of lymphopenia with the porcine circovirus type 2 induced post-weaning multisystemic syndrome. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, p.97-111. 2003.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, 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.

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

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

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

OPRIESSNIG T, THACKER EL, YU S, FENAUX M, MENG X-J, HALBUR PG. Experimental reproduction of postweaning wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 624-640. 2004.

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

PAEZ, J.G.; LIN, M.; BEROUKHIM, R.; LEE, J.C.; ZHAO, X.; RICHTER, D.J.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; SASAKI, H.; ALTSHULER, D.; LI, C.; MEYERSON, M.; SELLERS, W.R. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 71. 2004.

PALLARES, F.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S.D.; VILLAR, D.; JANKE, B.H.; YAGGER, M.J.; LARSON, D.J.; SCHWARTZ, K.J.; YOON, K.J.; HOFFMAN, L.J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US fields cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p.515-519. 2002.

PESCADOR, C.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos do Rio Grande do Sul. In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos (Abraves), 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2003. p. 105-106.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs

with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 357-361. 2001.

RAMOS-VARA, J.A.; DURAN, O.; RENDER, J.A.; CRAFT, D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 479-480. 1997.

RECTOR, A.; BOSSART, G.D.; GHIM, S.; SUNDBERG, J.P.; JENSON, A.B.; Van RANST, M. Characterization of a Novel Close-to-Root Papillomavirus from a Florida Manatee by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification: *Trichechus manatus latirostris* papillomavirus type. **Journal of Virology**, v. 78, p. 12698–12702. 2004.

RESENDES, A.R.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; MATEU, E.; CALSAMIGLIA, M.; DOMINGO, M. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2837-2844. 2004a.

RESENDES, A.; SEGALÉS, J.; BALASCH, M.; CASAMIGLIA, M.; SIBILA, M.; ELLERBROK, H.; MATEU, E.; PLANA-DURÁN, J.; MARKERTZ, A.; DOMINGO, M. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. **Veterinary Research**, v. 35, p. 83-90. 2004b.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A.R.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p.354-357. 2002.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUEZ-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 of Comparative Pathology**, v. 120, p. 59-78. 1999.

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

ROYER, R.L.; NAWAGITGYL, P.; HALBUR, P.G.; PAUL, O.S. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, p. 281-284. 2001

SÁNCHEZ, R.E.; MEERTS, P.; NAUWINCK, H.J.; PENZAERT, M.B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p.15-25. 2003.

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

SCHULZE, C.; SEGALÉS, J.; NEUMANN, G.; HLINAK, A.; CALSAMIGLIA, M.; DOMINGO, M. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). **The Veterinary Record**, v. 154, p. 694-696. 2004.

SEGALÉS, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DEL POZO, M.; NOVAL, R.; SACRISTAN, C.; DE LÃS HERAS, A.; FERRO, A.; LATIMER, K.S. First report of post-weaning multisystemic syndrome in pigs in Spain. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 600-601. 1997.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, 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.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, traqueo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 223-229. 2005.

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 Medical Science**, 65:405-408. 2003.

SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; KITAJIMA, K.; ASAI, T. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, p. 278-280. 2006.

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

SONG, Y.; JIN, M.; ZHANG, S.; XU, X.; XIAO, S.; CAO, S.; CHEN, H. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing *cap* protein of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 97-104. 2007.

SPILANE, P.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; ALLAN, G. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. **The Veterinary Record**, v. 143, p. 511-512. 1998.

STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. **Virology**, v. 291, p. 152-60. 2001.

- STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K.; CHOI, J.; LATIMER, K.S.; KANITZ, C.L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 57-62. 2001.
- THACKER, B.; THACKER, E. The PRDC battle continues. **Pig Progress**, v. 6, p.16-18. 2000.
- THACKER, E.L. Porcine respiratory disease complex - what is it and why does it remain a problem? **The Pig Journal**, v. 48, p. 66-70. 2001.
- THAKRAL, D.; NAYAK, B.; REHMAN, S.; DURGAPAL, H.; PANDA, S.K. Replication of a recombinant hepatitis E virus genome tagged with reporter genes and generation of a short-term cell line producing viral RNA and proteins. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1189–1200. 2005.
- THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M.C.; D'ALLARE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Veterinary Pathology**, v.35, p. 108-116. 1998.
- THOMSON, J.; MacINTYRE, N.; HENDERSON, L.; MIKLE, C.S. Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 412-417. 2001.
- TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN W.; KOCH M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, p. 64-66. 1982.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v. 91, p. 271-276. 1986.
- TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Archives of Virology**, v. 96, p. 39-57. 1987.
- TRUJANO, M.; IGLESIAS, G.; SEGALES, J.; PALACIOS, J.M. PCV-2 from emaciated pigs in México. **The Veterinary Record**, v. 148, p. 792. 2001.
- VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HÖFLE, U.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M.; GORTÁZAR, C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Research**, v. 35, p. 243-253. 2004.
- VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B.M.; ALLAN, G.M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.C. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 13288-13300. 2003.

VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; HERRMANN, B.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.C. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. **Immunology**, v. 115, p. 388-398. 2005.

VINCENT, I.E.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K.C. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. **Immunology**, v. 120, p. 47-56. 2007.

WADDILOVE, A.E.J.; MARCO, . Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field. In: Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress, 1, Ames, USA, 2002. **Anais...** Ames, USA: Iowa State University, 2002. p. 34.

WALKER, I.W.; KONOBY, C.A.; JEWHRST, V.A.; McNAIR, I.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.M.; COTTRELL, T.S.; ELLIS, J.A.; ALLAN, G.M. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 400-405. 2000.

WANG, X.; JIANG, W.; JIANG, P.; LI, Y.; FENG, Z.; XU., J. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 3374-80. 2006.

WELLENBERG, G.J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F.W.; STEVERINK, P.J.; HUNNEMAN, W.; VORST, T.J.V.D.; PEPERKAMP, N.H.; OHLINGER, V.F.; SCHIPPERS, R.; OIRSHOT, J.T.V.; 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.

WELLENBERG, G.J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; JONG, M.F.; BOERSMA, W.J.A.; ELBERS, A.R.W. Excessive porcine circovirus type 2 titres the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 203-214. 2004.

WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G.M.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; KRAKOWKA, S.; McNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J.A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 530-532. 1999.

ANEXOS

ANEXO 1  
Sequência de PCV2 depositadas no GenBank



>gi|116294344|gb|DQ923523.1| Porcine circovirus 2 isolate 15/5P from Brazil, complete genome  
 ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCGGCAGCAACATGCCAGCAAGAAGAATGG  
 AAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAAAGGTGGGTGTTTACACTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAG  
 AAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGTAATGAGGAAGGAC  
 GAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAAAGTGAAGTGGTATTT  
 GGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAAGCGAAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAA  
 GGCAACTTACTGATGGAGTGTGGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGA  
 GTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTTGTTCAGAAAATTT  
 CCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACTAATGTACAC  
 GTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGAAACCACAT  
 ACTGGAACCCACCTAGAAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTT  
 TTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAA  
 GGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACT  
 CCTCAACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTTTATCGGAGGATTACTTCCCTTGGTATTTTGGAAAGAAATGC  
 TACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTACCCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATAT  
 GAAATAAATTAAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTATTATTATTCATTAAGGGTTAAGTGGGGG  
 GTCTTTAAGATTAAATTTCTCTGAATTTGACATACATGGTTACACGGATATTGTATTCTTGGTCTGATATA  
 CTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGTAGTTTGTAGTCTCAGCCACAGCT  
 GATTTCTTTTGTGTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGAATCTAGGACAGGTTTGGGGGTAAAGTAGCG  
 GGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTACATAGGTGAGG  
 GCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCCCTGTCACCCTGGG  
 TGATCGGGGAGCAGGGCCAGAATTAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCG  
 GGGGTTTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG  
 GCGGTTTTGACTGTGGTTTCGCTTGATAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCAT  
 TTTTCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAG  
 ATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCATATCTGAAAACGAAAGA  
 AGTGCGCTGTAAGTATT

>gi|116294347|gb|DQ923524.1| Porcine circovirus 2 isolate 15/23R from Brazil, complete genome  
 ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCGGCAGCAACATGCCAGCAAGAAGAATGG  
 AAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAAAGGTGGGTGTTTACACTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAG  
 AAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGAGGTAATGAGGAAGGAC  
 GAACACCTCACCTCCAGGGGTTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAAAGTGAAGTGGTATTT  
 GGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAAGCGAAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAA  
 GGCAACTTACTGATGGAGTGTGGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGA  
 GTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTTGTTCAGAAAATTT  
 CCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACTAATGTACAC  
 GTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGAAACCACAT  
 ACTGGAACCCACCTAGAAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTT  
 TTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAA  
 GGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACT  
 CCTCAACTGCTGTCCAGCTGTAGAAGCTCTTTATCGGAGGATTACTTCCCTTGGTATTTTGGAAAGAAATGC  
 TACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTACCCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATAT  
 GAAATAAATTAAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTATTATTATTCATTAAGGGTTAAGTGGGGG  
 GTCTTTAAGATTAAATTTCTCTGAATTTGACATACATGGTTACACGGATATTGTATTCTTGGTCTGATATA  
 CTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGTAGTTTGTAGTCTCAGCCACAGCT  
 GATTTCTTTTGTGTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGAATCTAGGACAGGTTTGGGGGTAAAGTAGCG  
 GGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTACATAGGTGAGG  
 GCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCCCTGTCACCCTGGG  
 TGATCGGGGAGCAGGGCCAGAATTAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCG  
 GGGGTTTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG  
 GCGGTTTTGACTGTGGTTTCGCTTGATAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAATATGCCAT  
 TTTTCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAG  
 ATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCATATCTGAAAACGAAAGA  
 AGTGCGCTGTAAGTATT