

ABELARDO SILVA JUNIOR

CIRCOVÍRUS SUINO TIPO 2 (PCV2):  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONSTRUÇÃO  
DE VETORES PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO  
CAPSÍDEO

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para obtenção do  
título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**ABELARDO SILVA JUNIOR**

**CIRCOVÍRUS SUINO TIPO 2 (PCV2): CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO  
CAPSÍDEO**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.**

APROVADA: 29 de julho de 2005.

---

Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Pacheco Batista Fontes

---

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo

---

Dr. José Lúcio dos Santos

---

Dra. Zélia Inês Portela Lobato

---

Prof<sup>a</sup> Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo  
(Orientadora)

À minha querida mãe, Célia Monteiro da Silva.

Ao meu querido pai, Abelardo Francisco da Silva (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, Livia, Aristides e Alcebíades.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Layla, Matheus e Sophia.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Veterinária, com os quais aprendi durante meu amadurecimento científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão do suporte financeiro.

À querida professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, pela confiança, ensinamentos, orientação e, principalmente, pela amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Mauro Pires Moraes, pelos ensinamentos e pelo acompanhamento durante a execução do trabalho.

À professora Janice Reis Ciacci Zanella, pelo incentivo e acompanhamento.

Ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela disponibilidade do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores.

Ao senhor Valdir, funcionário do Laboratório de Virologia Molecular Animal.

Aos colegas do projeto circovírus suíno, Luíza, Orlando e Fernanda Miquelitto, pelo convívio diário, trabalho e pelo auxílio na execução dos experimentos.

Aos demais colegas do Laboratório de Virologia Molecular Animal e do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores

(Camila, Giuliano, Gilvan, Fernanda Souza, Larissa, Luciana, Karla, Sidimar e Carlos), pela colaboração na obtenção dos resultados.

Aos colegas dos Laboratórios de Virologia Molecular Vegetal e de Sequenciamento e Análises de Fragmentos de DNA, pelo auxílio.

Aos amigos Luciana, Camila, Márcia Cesário, Rosyane, Andressa, Atsuka, Kelly, Rejane, Jamária, Maria Eduarda, Eduardo Monteiro, Marcos, Paulo Ricardo, Giulio, Marcos, Roberson, Fabrício, Cléber, André, Antônio Henrique, Anderson, Rodrigo, Eduardo Costa, Wellington, João e Daniel, pelo incentivo e convívio.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Propriedades virais e moleculares do circovírus suíno.....	3
2.2 Aspectos epidemiológicos.....	7
2.3 Patogenia.....	8
2.4 Sinais clínicos e aspectos patológicos.....	9
2.5 Diagnóstico.....	11
2.6 Controle.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 Obtenção e manutenção dos isolados virais.....	15
4.2 Extração de DNA.....	16
4.3 Oligonucleotídeos .....	17
4.4 Amplificação por PCR.....	19
4.5 Construção do clone contendo todo o genoma viral .....	20
4.6 Construção do clone contendo toda a seqüência da cápside viral.....	21
4.7 Triagem bacteriana por PCR.....	22
4.8 Minipreparação e preparação em larga escala de DNA plasmidial....	23
4.9 Análise de restrição de DNAs plasmidiais.....	24
4.10 Transfecção de células SK6 via lipofectamina.....	27
4.11 Ensaios de imunofluorescência indireta.....	28
4.12 Determinação da seqüência de nucleotídeos.....	28
4.13 Análises das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos.....	29

5.	RESULTADOS.....	31
5.1	Isolamento viral e ensaios de PCR.....	31
5.2	Análise de restrição dos plasmídeos.....	33
5.3	Expressão da proteína do capsídeo viral em células SK6.....	36
5.4	Análise de seqüências e construção de agrupamentos genéticos.....	37
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÕES.....	51
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

### LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1-(A)- Estrutura genética do PCV.....	6
Figura 1- (B)- Representação esquemática do genoma viral.....	6
Figura 2. Análise histológica de amostra de tecido renal.....	15
Figura 3. Representação esquemática da estratégia de obtenção dos plasmídeos recombinates.....	26
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR do PCV1....	31
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR do PCV2....	32
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR da amplificação completa do DNA do PCV2.....	33
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose de produtos de digestão de plasmídeos. (A) Plasmídeo contendo o fragmento correspondente ao genoma do PCV2 clivado com <i>EcoRI</i> . (B) pCI-neo/capsídeoPCV2 clivado com <i>NheI/MluI</i> .(C) pCI-neo/capsídeoPCV2 clivado com <i>XbaI</i> .....	35
Figura 8. Detecção da proteína viral por microscopia de fluorescência.....	37
Figura 9. Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do clone contendo o fragmento completo do genoma viral.....	40
Figura 10. Agrupamento genético baseado na seqüência de nucleotídeos da ORF1 do PCV2LVMA.....	41

Figura 11. Agrupamento genético baseado na seqüência parcial de nucleotídeos da ORF2 do PCV2/LVMA.....	42
Figura 12. Seqüência de aminoácidos e nucleotídeos da replicase viral.....	43
Figura 13. Seqüência parcial de aminoácidos e nucleotídeos da cápside viral.....	44

### LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR do PCV1.....	18
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR de todo o genoma viral.....	18
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações do capsídeo viral do PCV2.....	19
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento.....	19
Tabela 5. Disposição das temperaturas e tempos utilizados nas reações de PCR.....	20
Tabela 6. Disposição das seqüências do PCV2 e seus respectivos números de acesso ao GenBank.....	30

### LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1. Seqüência parcial de nucleotídeos do PCV2 isolado pelo LVMA.	38
Quadro 2. Seqüência parcial de nucleotídeos de cada extremidade do clone contendo todo o genoma viral.....	39



## ABREVIATURAS

- bp - Pares de bases
- FLC - Clone contendo todo o genoma viral
- IF - Imunofluorescência
- IHC - Imunohistoquímica
- IHS - Hibridização *in situ*
- LVMA - Laboratório de Virologia Molecular Animal
- MHC - Complexo de histocompatibilidade
- ORF - Fase de leitura aberta
- PCR- Reação da polimerase em cadeia
- PCV - Circovírus suíno
- PDNS - Síndrome dermatológica e nefropática suína
- PI - Persistentemente infectado
- PMWS - Síndrome da refugagem multissistêmica
- PNP - Pneumonia proliferativa necrotizante
- PPV - Parvovírus suíno
- PRRS - Síndrome reprodutiva e respiratória suína
- PRRSV - Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína

## RESUMO

SILVA JUNIOR, Abelardo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2005. **Circovírus Suino Tipo 2 (PCV2): Caracterização Molecular e Construção de Vetores para Expressão da Proteína do Capsídeo.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Conselheiros: Mauro Pires Moraes e Janice Reis Ciacci Zanella.

O genoma do PCV apresenta aproximadamente 1.760 pb, composto de uma molécula de DNA fita simples, circular e de duas principais fases de leitura aberta (ORFs): ORF1 que codifica a replicase viral e ORF2 que codifica a proteína da cápside viral. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de um isolado de PCV2 e produzir um vetor de expressão contendo a seqüência do capsídeo viral. O DNA de PCV2, extraído de células SK6 infectadas, foi amplificado por PCR e, em seguida, confirmado por seqüenciamento. Após a confirmação do isolamento, todo o genoma viral foi amplificado por PCR, inserido em um vetor de clonagem, e o clone recombinante foi submetido a reações de seqüenciamento. Foram realizados ensaios de PCR que amplificavam o segmento gênico do capsídeo viral e o produto de amplificação foi inserido em um vetor de expressão. Este DNA plasmidial foi transfectado em células SK6 livres de PCV. A expressão da proteína viral foi confirmada por imunofluorescência indireta. A análise da seqüência completa de nucleotídeos da ORF1 e parcial ORF2 do clone contendo todo genoma viral mostrou respectivamente, 99,27% e 97,99% de identidade com as demais seqüências disponíveis no GenBank. Atualmente, não há nenhum método vacinal disponível no mercado para o controle da circovirose suína. Os resultados obtidos neste trabalho serão de grande importância para o início de estudos de vacinações em modelos animais.

## ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Abelardo. Universidade Federal de Viçosa, July 2005.

**Porcine circovirus type 2 (PCV2): Molecular Characterization and Vectors Construction for Capsid Protein Expression.** Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Committee members: Mauro Pires Moraes and Janice Reis Ciacci Zanella.

PCV presents a single-stranded circular DNA genome of approximately 1760 bp, with two main open reading frames (ORFs): ORF1 that encodes viral replicase and ORF2 that encodes viral capsid protein. The aim of this work was to perform a molecular characterization of a PCV2 isolate and produce an expression vector containing the sequence of viral capsid protein. PCV2 DNA extracted from infected SK6 cells, was amplified by PCR and then confirmed by sequencing. After confirmation of PCV2 isolation, all viral genome was amplified by PCR and inserted in a cloning vector, and the recombinant clone was sequenced. To ORF2 subcloning, PCR assays that amplified the genomic segment of capsid protein were performed and the PCR product was inserted in an expression vector. This plasmidial DNA was transfected in SK6 cells free of PCV. The expression of the viral protein was confirmed by indirect immunofluorescence methods. ORF1 complete nucleotide sequence analysis and ORF2 partial nucleotide sequence analysis revealed respectively, 99.27% and 97.99% of identity with sequences retrieved from GenBank. Until now there is no available vaccinal method to control swine circovirolosis. The results obtained in this work will be of great importance to the beginning of vaccination studies in animal models.

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura industrial tem mostrado um significativo crescimento nos últimos anos, sendo responsável por grande participação na economia do agronegócio mundial. Um ponto importante desse crescimento na produção envolve o aprimoramento de técnicas de manejo, nutrição e reprodução de animais geneticamente melhorados. Entretanto, falha nos programas de sanidade pode comprometer o lucro da produção.

Dentro do panorama mundial de globalização, onde o desenvolvimento do setor mostra um intenso crescimento do trânsito de animais e produtos entre países, há maiores possibilidades da emergência de doenças consideradas exóticas e, portanto, demanda uma maior atenção nos programas de sanidade. Baseado neste contexto, os agentes infecciosos de suínos têm recebido grande atenção. A partir da década de 90, muitos países tiveram grandes perdas produtivas devido a agentes patogênicos, principalmente vírus.

O circovírus suíno (PCV) está amplamente distribuído em suínos por todo o mundo (DULAC *et al.*, 1989; TISCHER *et al.*, 1995; TISCHER *et al.*, 1986).

O PCV foi primeiramente identificado como um contaminante das células PK-15 (TISCHER *et al.*, 1982) e subsequente classificado dentro da família *Circoviridae* (LUKERT *et al.*, 1995). O PCV é um pequeno vírus não envelopado contendo um genoma de DNA fita simples circular e reconhecido como um patógeno de suíno a partir da década de 90. Dois tipos de PCVs têm sido caracterizados e designados, PCV tipo 1 (PCV1) e PCV tipo 2 (PCV2), os quais são relacionados geneticamente e antigenicamente. Infecções experimentais de suínos com PCV1 não produzem doença clínica, sendo este vírus considerado não patogênico aos suínos (ALLAN *et al.*, 1995; ALLAN & ELLIS, 2000; BOLIN *et al.*,

2001). Diferentemente do PCV1, o PCV2 tem sido associado a uma síndrome denominada circovirose suína.

Análise da seqüência de nucleotídeos demonstrou que o agente causal da síndrome da refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS) refere-se ao PCV2, diferente do PCV1 contaminante das células PK-15 (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1998; MOROZOV *et al.*, 1998). A identidade entre as duas seqüências de nucleotídeos do PCV1 e PCV2 é menor que 80% e ambas possuem seis fases de leitura aberta (ORFs) (BASSAMI *et al.*, 1998; HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1998; MOROZOV *et al.*, 1998).

Evidências mostram que outras enfermidades, além da PMWS, estão associadas ao PCV2, como a síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS), pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP), tremor congênito (CT-AII), miocardite perinatal e falhas reprodutivas (ALLAN & ELLIS, 2000).

O primeiro isolamento brasileiro foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA SUÍNOS E AVES – Concórdia, SC), onde o antígeno de PCV2 foi detectado por testes de imunoperoxidase e pela presença de lesões características da PMWS em amostras de tecidos (CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2001).

Os prejuízos econômicos causados pela circovirose suína são grandes. Anualmente, cada vez mais são descritos casos novos da doença, diminuindo assim a produtividade das granjas afetadas. Atualmente, o único controle da doença está na correção do manejo sanitário da granja e métodos vacinais que evite a ocorrência da infecção ainda estão sendo testados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O circovírus suíno e aspectos moleculares

O circovírus suíno (PCV) é um pequeno vírus não envelopado que contém uma fita simples de DNA de 1,76 Kb. O PCV é classificado dentro da família *Circoviridae*, a qual possui outros membros: vírus da anemia infecciosa das galinhas, vírus da doença do bico e das penas de psitacídeos e circovírus dos pombos (BASSAMI *et al.*, 1998; MANKERTZ *et al.*, 1998a; MANKERTZ *et al.*, 2000; MEEHAN *et al.*, 1997; MEEHAN *et al.*, 1998; TODD *et al.*, 1991).

O PCV é resistente à inativação pós-exposição a pH 3,0, clorofórmio, a temperaturas variando de 56° C a 70°C, possui um gradiente de densidade em CsCl de 1,33-1,34 mg/mL e um coeficiente de sedimentação de 57S comparado ao coeficiente de sedimentação do enterovírus bovino (ALLAN *et al.*, 1994b).

O genoma do PCV1 e PCV2 contém 1759 pb e 1768 pb, respectivamente (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1997), são organizados de forma similar e possuem 76% de identidade entre si. Ambos contêm duas principais fases de leitura aberta (ORFs): ORF1 e ORF2 (Figura 1) (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1997; MEEHAN *et al.*, 1998; MOROZOV *et al.*, 1998).

A ORF1 codifica uma proteína associada à replicação (proteína Rep), essencial para a replicação. A ORF2 codifica uma proteína que possui uma seqüência conservada de aminoácidos básicos no terminal amínico, sendo envolvida na formação do capsídeo viral (NAWAGITGUL *et al.*, 2000). Há uma identidade de 85% da ORF1 entre PCV1 e PCV2 e 65% de identidade da ORF2 entre PCV1 e PCV2 (CASTRO *et al.*, 2003). A proteína codificada pela ORF2 do PCV1 e PCV2 são similares no tamanho em aproximadamente 30 kDa (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*,

1998; MOROZOV *et al.*, 1998). A ORF1 do PCV1 e PCV2 possui 936 e 942 pb, respectivamente, e a ORF2 de ambos os PCVs possui 699 pb (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1997).

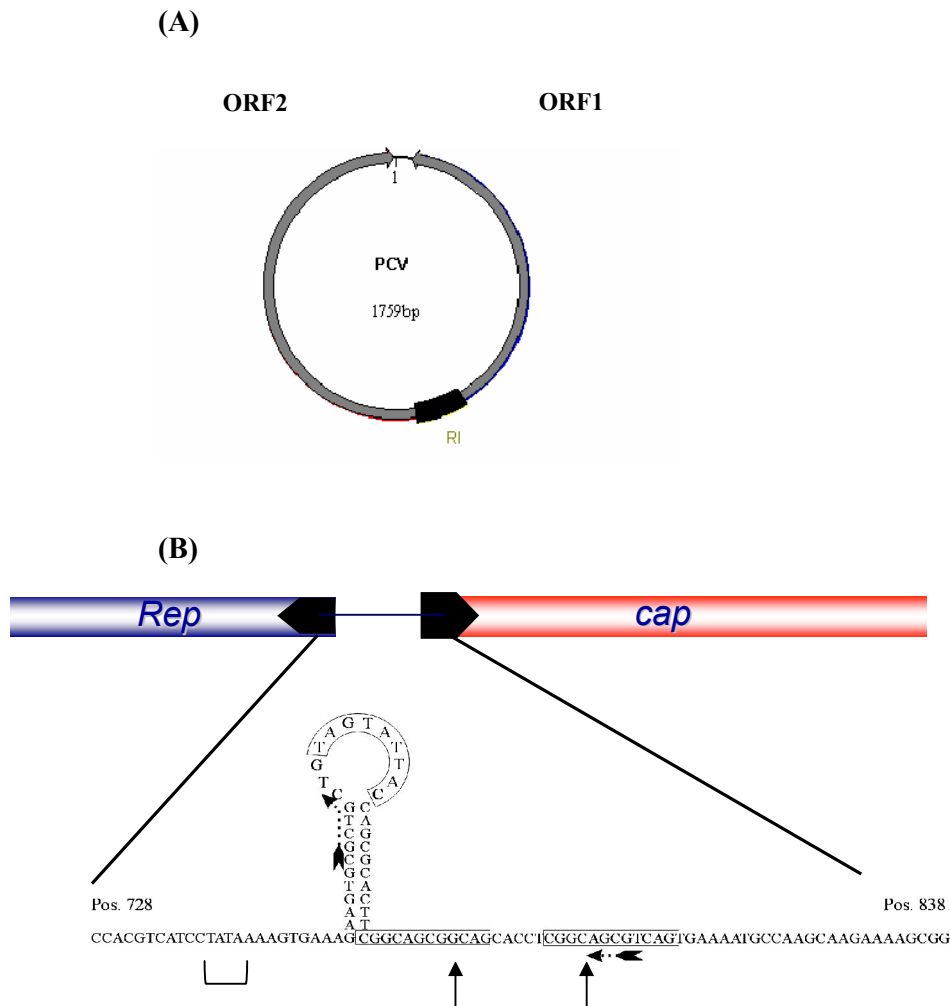
Reações entre soros de suínos anti-PCV2 e peptídeos sintéticos revelaram que há três possíveis regiões imunoreativas na cápside viral (MAHE, *et al.*, 2000). LEKCHAROENSUK *et al.* (2004) demonstraram que as regiões de aminoácidos correspondentes às posições 47 a 63, 165 a 200 e os três últimos aminoácidos do terminal carboxílico do capsídeo viral estão envolvidas na formação dos epítomos imunoativos. Os primeiros 46 resíduos de aminoácidos da cápside viral correspondem a aminoácidos básicos e não estão envolvidos na formação conformacional dos epítomos (HAMEL *et al.*, 1998). Estes resíduos podem estar envolvidos na formação da superfície interna da proteína que interage com as cargas negativas do DNA viral durante a montagem do vírus (LEKCHAROENSUK *et al.*, 2004).

O PCV replica no núcleo da célula infectada pela formação de uma fita dupla (RF dsDNA) por círculo rolante (TISHER *et al.*, 1995). A replicação *in vitro* do DNA do PCV mostra ser dependente das enzimas da fase S do ciclo de crescimento celular. A replicação somente se inicia após a passagem da célula pela mitose (TISCHER *et al.*, 1995). Durante a fase G1 do ciclo de crescimento celular, o fator de ativação AP-1 é produzido e este se liga especificamente a seqüência consenso TGA (C/G) TCA (FRANZA *et al.*, 1988). A seqüência TGAGTCT, que é similar ao sítio de ligação AP-1, é identificado no genoma do PCV.

MANKERTZ *et al.* (1998b) demonstraram a presença de uma seqüência (5'-TAGTATTAC-3'), denominada de elemento estruturalmente conservado, localizado na região intergênica da ORF1 e ORF2 como a origem de replicação e, também, como sítio de atuação da proteína Rep. A identidade entre as proteínas essenciais para a replicação (Rep), indicam

que ambos os PCVs são relacionados aos nanovírus de planta (MEEHAN *et al.*, 1997). Adjacente ao elemento estruturalmente conservado, há hexâmeros (5'-CGGCAG-3') repetidos quatro vezes, H1-H4 (nt 785-813). Os hexâmeros H2 e H3 são separados por 5 pb, a seqüência H4 possui uma única diferença de nucleotídeos (5'-CGTCAG-3') (STEINFELDT *et al.*, 2001). Estudos preliminares mostraram que há nove RNAs-PCV2 (*CR*, *Rep*, *Rep'*, *Rep3a*, *Rep3b*, *Rep3c*, *NS515*, *NS672*, e *NS0*) e 12 RNAs-PCV1 (*CR*, *Rep*, *Rep'*, *Rep3a*, *Rep3b*, *Rep3c-1*, *Rep3c-2*, *rep3c-3*, *Rep3c-4*, *Ns462*, *Ns642*, e *NS0*) que foram detectados durante a infecção de células PK-15 (CHEUNG, 2003a). O RNA *Rep* é capaz de codificar toda a cadeia protéica da *Rep*, e parece ser um transcrito primário que origina os outros RNAs por processamento (CHEUNG, 2003b).





**Figura 1-(A)- Estrutura genética do PCV.** Em destaques estão a ORF2 que codifica a proteína do capsídeo viral e também a ORF1 que codifica as proteínas de replicação (Rep). Em preto, é mostrada uma região intergênica que origina uma estrutura em forma de grampo, a origem da replicação do PCV.

**(B)- Representação esquemática do genoma viral.** Estão representadas as duas principais ORFs do genoma viral, a ORF1 e ORF2. A região intergênica (RI em *l*) apresenta uma estrutura em forma de grampo. No ápice da estrutura é mostrado o elemento estruturalmente conservado, onde ocorre a clivagem pela proteína Rep e o início do processo replicativo. Podem ser observados também o TATA Box (colchete) e Hexâmeros (seta) (MANKERTZ *et al.*, 1997).

## 2.2. Aspectos epidemiológicos

Em 1996, no oeste do Canadá, uma nova doença infecciosa surgiu em suínos livres de patógenos específicos (SPF), sendo identificada e notificada por CLARK & HARDING (1997). Posteriormente, esta doença foi denominada de síndrome da refugagem multissistêmica (PMWS). Esta síndrome foi identificada e reconhecida em animais da Ásia, América do Sul e do Norte e Europa (LECANN *et al.*, 1997; SEGALÉS *et al.*, 1997; SPILLANE *et al.*, 1998; CHOI & CHAE, 1999; HINRICHS *et al.*, 1999; ONUKI *et al.*, 1999; ALLAN & ELLIS, 2000; CHOI *et al.*, 2000; KISS *et al.*, 2000; VYT *et al.*, 2000; WELLENBERG *et al.*, 2000; BOREL *et al.*, 2001; TRUJANO *et al.*, 2001; ALLAN *et al.*, 2002; CELER & CARASOVA, 2002; SARRADELL *et al.*, 2002; SAOULIDIS *et al.*, 2002). Isto indica que a infecção pelo PCV2 é distribuída mundialmente, causando, portanto, sérios impactos econômicos na indústria mundial produtora de suínos (FENAUX *et al.*, 2000).

CIACCI-ZANELLA *et al.* (2003) detectaram por PCR a presença do DNA viral em amostras de lesões teciduais de 20 animais de 5 a 12 semanas de idade de diferentes granjas da região sul do Brasil, confirmando o diagnóstico do PCV2 como agente etiológico da PMWS no País.

O PCV1 tem mostrado ser capaz de infectar células de suínos e bovinos *in vitro*, mas não é capaz de infectar células humanas ou de ovinos (ALLAN *et al.*, 1994b). Foi demonstrada a excreção de PCV1 em fezes e muco nasal de 13 a 14 dias pós-infecção em animais soro negativos e infectados experimentalmente (TISHER *et al.*, 1986). Uma associação de PCV2 com abortos foi descrita no Canadá e antígenos de PCV2 foram identificados em lesões de fetos abortados (WEST *et al.*, 1999).

O ácido nucléico viral foi detectado em fezes, saliva e “swabs” oculares em suínos após trinta e um dias de infecção com PCV2 isolado de

cultivo celular (KRAKOWKA *et al.*, 2000). A técnica de PCR foi usada também para detectar a presença do ácido nucléico do PCV2 em fezes, urina e “swabs” nasais de animais naturalmente infectados pelo circovírus suíno (CALSAMIGLIA *et al.*, 2001, SIBILA *et al.*, 2001). Baseado nestes estudos, o PCV2 pode também ser transmitido por secreções oronasais, fezes e urina (SEGALÉS *et al.*, 2002a).

A morbidade e mortalidade da doença são variáveis entre granjas e entre baias da mesma granja. Normalmente, as taxas variam entre 4-30% e 70-80%, respectivamente (SEGALÉS *et al.*, 2002a).

### 2.3. Patogenia

As bases patogênicas da qual o PCV2 é associado a PMWS ainda são pouco esclarecidas. De fato, a relação entre o PCV2 e algumas manifestações de agravo têm sido estabelecidas não somente na presença do vírus como agente causal único da doença (SEGALÉS *et al.*, 2004).

Alguns autores têm argumentado a necessidade de uma co-infecção para o desenvolvimento da doença (ALLAN *et al.*, 1999; CHO & CHAE, 2000) ou cofatores (ALLAN *et al.*, 2000; KRAKOWKA *et al.*, 2001; KYRIASKIS *et al.*, 2001). A PMWS tem sido associada à combinação do PCV2 com outros patógenos virulentos, como o vírus da síndrome suína reprodutiva e respiratória (PRRSV), vírus da influenza suína, parvovírus suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (KIM *et al.*, 2002; PALLARES *et al.*, 2002). Estas infecções podem confundir e complicar a apresentação clínica da doença.

Exames hematológicos revelaram uma redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células B, resultando em um quadro de depleção linfóide nos animais doentes (SEGALÉS *et al.*, 2001). Os níveis de mRNA de IL-1 $\alpha$  e IL-10 demonstraram estar aumentados nos animais afetados, e níveis de mRNA

de IL-2 e IL-2R $\alpha$  (CD25) parecem sofrer uma redução (SIPOS *et al.*, 2004).

Análises na cinética celular mostraram uma linfopenia conseqüente da diminuição de linfócitos B CD21<sup>+</sup> e linfócitos T CD3<sup>+</sup>. Toda a subpopulação de linfócitos Th de memória CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, Th “naïve” CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, células Tc CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e células  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> foram susceptíveis a infecção pelo PCV2. As células NK CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> foram também diminuídas nos animais afetados com PMWS (NIELSEN *et al.*, 2003).

O PCV pode replicar em culturas de macrófagos e monócitos de bovinos e suínos (ALLAN *et al.*, 1994a). Em culturas de macrófagos alveolares de suínos, o PCV não afeta a habilidade da célula em fagocitar e eliminar células que estão acopladas ao complemento ou que expressam receptores Fc para ligação de imunoglobulinas. McNEILLY *et al.* (1996) observaram um aumento transiente no complexo de histocompatibilidade (MHC) da classe I em células infectadas com PCV e uma diminuição na expressão de MHC classe II. Um estudo preliminar mostrou que o PCV2 pode causar viremia e que o vírus pode replicar em fetos causando morte fetal e mumificação (PENSAERT *et al.*, 2004). Esses dados mostram a incapacidade de animais severamente afetados pelo PCV2 de apresentar uma resposta imune eficiente, entretanto, não está totalmente claro como o vírus atua sobre as células do sistema imune de animais infectados.

#### **2.4. Sinais clínicos e aspectos patológicos**

A PMWS é a síndrome mais importante causada pela infecção do circovírus suíno (HARDING, 2004). Os sinais clínicos que formam a base para o diagnóstico preliminar são perda de peso, dispnéia, aumento dos linfonodos, diarreia, palidez da pele e icterícia (HARDING & CLARK, 1997; HARDING *et al.*, 1998; CONTTRELL *et al.*, 1999; HARMS, 1999).

Os sinais clínicos da PMWS são tipicamente encontrados em animais de 7 a 15 semanas de idade (HARDING *et al.*, 1998).

A síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) é uma doença que afeta animais de 1,5 a 4 meses de idade (SMITH *et al.*, 1993; THIBAUT *et al.*, 1998). Nos casos fatais, são observadas lesões cutâneas que consistem em vasculite necrotizante que afetam a derme, levando a uma necrose subcutânea e úlceras hemorrágicas dermais (CHOI & CHAE, 2001; DURAN *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1993; THIBAUT *et al.*, 1998).

O tremor congênito em suínos é causado pela desmielinização da medula cerebral e espinhal. A mortalidade pode alcançar taxas acima de 50%, como resultado da incapacidade motora do animal. A associação do PCV2 ao tremor congênito é controversa (CHAE, 2004). Estudos também mostram a hipótese de que o PCV1 e PCV2 não estão ligados ao tremor congênito (KENNEDY *et al.*, 2003).

A pneumonia necrotizante proliferativa (PNP) foi inicialmente descrita em 1990 no Canadá, como um problema respiratório em animais de creche e terminação (MORIN *et al.*, 1990), podendo ser causada pelo vírus influenza A (GIRARD *et al.*, 1992). Entretanto, outros estudos mostraram que a PNP pode ser resultado da co-infecção do PRRSV e PCV2 (PESCH *et al.*, 2000).

Existem estudos da associação do PCV2 a falhas reprodutivas. Os indicadores clínicos em granjas afetadas incluem elevadas taxas de abortos, retorno ao cio e mumificação fetal (JOSEPHSON & CHARBONNEAU, 2001; KIM *et al.*, 2004; LADEKJAER-MIKKELSEN *et al.*, 2001; O'CONNOR *et al.*, 2001; WEST *et al.*, 1999). O desenvolvimento de animais persistentemente infectados seguido da infecção uterina pode ser afirmado com base na evidência de recém nascidos com viremia e ausência de anticorpos anti-PCV não detectados na imunofluorescência (OHLINGER *et al.*, 2000).

O aumento dos linfonodos (principalmente o inguinal, submandibular, mesentérico e mediastinal) é uma das alterações patológicas mais comum de animais com PMWS. Em menor proporção de ocorrência, os linfonodos podem apresentar áreas de necrose multifocal visíveis macroscopicamente. Uma porcentagem de animais afetados pela PMWS pode apresentar também atrofia e descoloração hepática, principalmente em casos de ocorrência de icterícia tipicamente evidente, e o córtex renal com focos de necrose (SEGALÉS *et al.*, 2002a).

As principais lesões histológicas apresentadas pela PMWS incluem a presença de linfocitos e granulomas inflamatórios nos pulmões, rins e tecidos linfóides, assim como, depleção linfóide (CLARK, 1997). Pneumonia intersticial subaguda é comum nas lesões pulmonares (ROSSELL *et al.*, 1999). Em alguns casos é possível ver grandes histiocitos e células gigantes multinucleares na área alveolar. Nos casos crônicos, é possível verificar uma bronquiolite fibrosa (CLARK, 1997, SEGALÉS *et al.*, 2002a). As lesões hepáticas têm sido descritas pela ocorrência de infiltrado inflamatório na área portal, necrose de hepatócitos, expansão e vacuolização do citoplasma de hepatócitos (CLARK, 1997).

## **2.5. Diagnóstico**

O diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados pela doença (ALLAN & ELLIS, 2000). Não há efeito citopático causado pelo PCV em cultivo celular. Métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ* (IHS), imunohistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (IIF) (ELLIS *et al.*, 1998, 1999; MOROZOV *et al.*, 1998; ALLAN *et al.*, 1999), assim como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (ALLAN *et al.*, 1999; LAROCHELLE *et al.*, 1999), e análises do

polimorfismo dos fragmentos em ensaios de enzimas de restrição (RFLP) (NAYAR *et al.*, 1997). O ácido nucléico do PCV2 é detectado no citoplasma de histiócitos, de células gigantes multinucleares e outras células da linhagem de macrófagos e monócitos, assim como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas de tecidos linfóides (ROSELL *et al.*, 1999; ALLAN & ELLIS, 2000). Também é possível detectar o PCV2 em animais clinicamente normais; nestes casos a massa viral permanece baixa e as lesões possuem intensidade muito baixa (QUINTANA *et al.*, 2001).

Os diagnósticos diferenciais da circovirose suína podem ser amplos, dependendo dos sinais clínicos apresentados pelos animais da granja. Primeiramente e mais importante é incluir na lista de doenças diferenciais as enfermidades respiratórias, principalmente a PRRS; entretanto, a soroprevalência do PRRSV é amplamente distribuída em muitos países, o que torna mais difícil a diferenciação da circovirose suína e da PRRS (SEGALÉS *et al.*, 2002 b). Além disso, todas as doenças ou condições que envolvem a refugagem de animais podem ser incluídas na lista de diagnóstico diferencial (HARDING & CLARK 1997).

## **2.6. Controle**

O PCV2 é um vírus muito estável e persistente no meio ambiente da granja e a realização da erradicação viral torna-se muito difícil (KAMSTRUP *et al.*, 2004). O tratamento e o controle de animais com PMWS têm ações de urgência nos princípios das práticas de manejo sanitário da granja. Poucas pesquisas têm sido realizadas nesta área (HARDING, 2004). As mudanças devem ocorrer nas práticas de manejo de higiene e redução do estresse em diferentes estágios da criação. As medidas devem ainda incluir a redução na mistura de animais, fluxo adequado (todos dentro/todos fora) e redução na densidade de animais, especial

cuidado na castração e atenção na qualidade do ar, qualidade de criação pós-desmame e nos períodos de crescimento (SEGALÉS *et al.*, 2002a).

Outras estratégias para prevenir esta doença podem incluir a administração de produtos imunomoduladores (KRAKOWKA *et al.*, 2001) e tratamento pós-infecção com soro hiperimune via injeções subcutâneas, o que tem mostrado sucesso na redução da mortalidade de animais severamente doentes (FERREIRA *et al.*, 2001).

Atualmente, existem perspectivas promissoras em relação ao desenvolvimento de um método vacinal para o controle da circovirose suína. A grande porcentagem na conservação de genes estruturais entre diferentes isolados de PCV2 pode favorecer o estudo e a construção de agentes vacinais para o controle da circovirose suína (KAMSTRUP *et al.*, 2004).

FENAUX *et al.* (2004) avaliaram a eficácia vacinal de um vírus quimérico PCV1-2 e os dados do trabalho mostraram que quando os suínos foram vacinados por via intramuscular com o vírus quimérico PCV1-2 vivo, assim como imunizados com o DNA desta construção, induziram uma proteção contra a infecção do PCV2.



### **3. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar molecularmente o isolado de PCV2 encontrado pelo Laboratório de Virologia Molecular Animal (LVMA)/BIOAGRO/UFV e produzir manipulações no genoma deste vírus, com intuito de produzir clones contendo toda a seqüência de nucleotídeos e outro contendo a seqüência de nucleotídeos codificadores do capsídeo viral.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

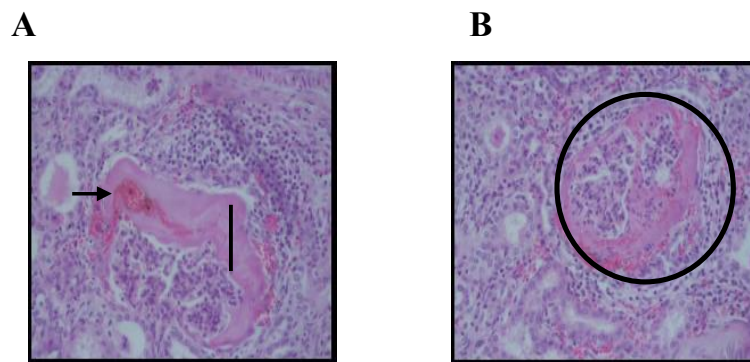
- Realizar a caracterização molecular do isolado viral;
- Construir DNAs plasmidiais contendo o genoma completo (FLC) do circovírus suíno;
- Construir um plasmídeo senso positivo da seqüência codificadora da cápside viral;
- Transfectar o plasmídeo contendo a seqüência codificadora da cápside viral em células SK6;
- Detectar a presença de antígenos virais nas células transfectadas utilizando ensaios de imunofluorescência indireta.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Virologia Molecular Animal (LVMA)/BIOAGRO/UFV, onde foram realizados todos os ensaios de biologia molecular e no Laboratório de Virologia Animal/Departamento de Veterinária/UFV, onde foram realizados os experimentos de virologia clássica.

### 4.1. Obtenção e manutenção de isolados virais

Amostras de tecido renal de um animal com infecção pelo PCV2 de uma granja da cidade de Ponte Nova com suspeita da síndrome PDNS foram coletadas em N<sub>2</sub> líquido, armazenadas a -70°C, maceradas e homogeneizadas em MEM contendo penicilina (500 U/μL) e estreptomicina (500 μg/μL), segundo MONNERAT (2003). Essa mesma amostra formalizada a 10% foi encaminhada ao setor de Patologia do Departamento de Veterinária/UFV para a confecção dos cortes histológicos segundo o método descrito por GRIMALDI FILHO (1981). A análise histológica das amostras utilizadas para o isolamento viral é mostrada na Figura 02.



**Figura 02. Análise histológica de amostra de tecido renal. (A)** A seta mostra o foco hemorrágico e o tracejado mostra o espessamento da cápsula glomerular. **(B)** O círculo indica a presença de infiltrado inflamatório intraglomerular e extraglomerular.

O isolamento do vírus foi realizado em cultura de células de linhagem de rim de suíno “SK6” livres de PCV, mas que mostraram ser susceptíveis à infecção pelo PCV1 e PCV2 (MONNERAT, 2003). Dois frascos de 25 cm<sup>2</sup> de células SK6 semiconfluentes, contendo aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células, foram inoculadas com 1 mL do inócuo e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> para adsorção do vírus. Em seguida, 5 mL do meio essencial mínimo (MEM-CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino 10% (CULTILAB) e antibióticos foram adicionados aos frascos e a incubação prolongada por mais 48 horas. Logo após a incubação, as células foram tratadas com D-glicosamina 300mmoles/L (SIGMA) durante 45 minutos e incubadas por 48 horas (TISCHER *et al.*, 1987). Um dos frascos foi utilizado para a purificação de DNA e as células do outro frasco foram transferidas para outro frasco de 25 cm<sup>2</sup> para posterior propagação e a cada duas passagens foram congeladas. Após duas passagens, o DNA total foi isolado das células infectadas e não-infectadas e testadas por PCR com a finalidade de se detectar a presença de DNA do PCV2, utilizando os oligonucleotídeos descrito na Tabela 3.

As células utilizadas no isolamento viral foram tripsinizadas, aliqüotadas em microtubos de 1,5 mL contendo MEM 70%, soro fetal bovino 20% e DMSO 10% v/v (VETEC), após a confirmação do isolamento do PCV2 e, em seguida, armazenadas a -80°C.

Todos os procedimentos de manipulações de DNA foram realizadas de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989).

#### **4.2. Extração de DNA**

A extração de DNA da monocamada de células foi executada utilizando-se culturas celulares de SK6 infectadas ou não com amostra de tecidos de animais com suspeita de infecção por PCV2. Para cada extração, aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células contidas em um frasco de 25 cm<sup>2</sup>, foram

imediatamente transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionada uma solução 1:1 de TE (TrisCl 10 mM, pH8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e tampão de extração (TrisCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0; SDS 0,5%) e, em seguida, o tubo foi incubado a 37°C por 1 hora. Após agitação, foi acrescentada proteinase K 100µg/mL (GibcoBRL) e a solução foi incubada novamente em banho-maria a 56°C até que o tecido se apresentasse totalmente lisado. Logo em seguida, foi acrescentado igual volume de fenol saturado com TrisCl 0,5 M, pH 8,0 (INVITROGEN), o tubo foi invertido durante cerca de 3 minutos, centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e a fase aquosa (superior) foi retirada e acondicionada em um novo tubo. Esse último passo foi repetido por mais duas vezes com fenol/clorofórmio (1:1) e, por último, somente com clorofórmio (MERCK). Em seguida, o DNA total foi precipitado com 0,4 volumes de acetato de amônia 5 moles/L (SIGMA) e 2 volumes de etanol 100% (SIGMA) e lavado com etanol 70% por duas vezes. O precipitado foi seco, ressuspenso em um volume de 30 a 100 µL de água destilada estéril (MILLI Q) conforme o rendimento de DNA e as amostras analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL), corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta.

### **4.3. Oligonucleotídeos**

#### **4.3.1. Oligonucleotídeos utilizados para detecção do PCV1**

Os oligonucleotídeos utilizados para detecção da possível contaminação das células SK6 com PCV1 foram construídos a partir da região que codifica a replicase viral. A Tabela 1 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR do PCV1.**

Designação	Seqüência	Coordenados
F110	5'-TCCGAGGAGGAGAAAAACAA-3'	"Forward"
R751	5'-TCTACAGTCAATGGATACCGGTCA-3'	"Reverse"

#### 4.3.2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de todo o genoma do PCV2

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de todo o DNA viral do PCV2 foram construídos pela sobreposição de cada oligonucleotídeo no sítio de restrição da enzima *ClaI*, correspondente à posição 743 do genoma viral. A Tabela 2 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados.

**Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR de todo genoma viral.**

Designação	Seqüência	Coordenados
PCV2FULLF	5'- <u>CCATCGATATCCATTGACTGTAGAGAC</u> -3'	"Forward"
PCV2FULLR	5'- <u>CCATCGAT</u> CACACAGTCTCAGTAGATC-3'	"Reverse"

- A seqüência de nucleotídeos correspondente ao sítio da enzima de restrição *ClaI* encontra-se sublinhada.
- A adição de bases degeneradas na extremidade 5' para o aumento da eficiência de clivagem encontra-se em negrito e em itálico.

#### 4.3.3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do capsídeo viral do PCV2

Os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do capsídeo viral foram também utilizados para os testes periódicos de contaminação acidental das células SK6 livres de PCV2 e detecção de DNA viral em células de isolamento. Na região terminal 5' dos oligonucleotídeos foram criados sítios de enzimas de restrição que serviram para o acoplamento do fragmento de PCR ao vetor de expressão. A Tabela 3 mostra a seqüência de bases dos oligonucleotídeos descritos acima.

**Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações do capsídeo viral do PCV2.**

Designação	Seqüência	Coordenados
FCAP	5'- <i><b>CGG</b></i> <u>GCTAGC</u> <i><b>CG</b></i> GATGACGTATCCAAG-3'	"Forward"
RCAP	5'- <i><b>GACGCGT</b></i> <u>CGTT</u> AGGGTTTAAGTG-3'	"Reverse"

- As seqüências de nucleotídeos correspondentes aos sítios artificiais das enzimas de restrição *NheI* e *MluI* presentes nos oligonucleotídeos "Forward e Reverse", respectivamente, encontram-se sublinhadas.
- A adição de bases degeneradas na extremidade 5' para o aumento da eficiência de clivagem encontra-se em negrito e em itálico.

#### 4.3.4. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do clone que contém todo o genoma viral

Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de sequenciamento das regiões mais internas do clone contendo toda a seqüência do PCV2 foram construídos a partir de seqüências da replicase viral. A Tabela 4 mostra a seqüência dos oligonucleotídeos descritos acima.

**Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento.**

Designação	Seqüência	Orientação
F426	5'- GGTCTTTGGTGACTGTAGGCCGA-3'	"Forward"
R516	5'- ATCTTCCCGCTCACTTTCAA-3'	"Reverse"

#### 4.4. Amplificação por PCR

A mistura de reação para os ensaios de PCR foi preparada em água estéril (MILLI Q), consistindo de Tris-HCl 10 mM, pH 9,0 a 25°C (GIBCOBRL), KCL 50 mM (GIBCOBRL), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (GIBCOBRL), 0,2 mM de cada um dos dNTPs (GIBCOBRL), 0,3 M de cada oligonucleotídeo (INVITROGEN) e Taq DNA polimerase 2,5 U/μL (PHT). Alíquotas (23 μL) da mistura de reação foram colocadas em tubos de 0,2 mL. Após a

adição do DNA (2  $\mu\text{L}$ ), a mistura foi transferida para um termociclador (MJC, Inc. PTC-100) pré-aquecido a 80°C. Abaixo são mostradas as temperaturas usadas nas reações de PCR (Tabela 5).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL), corado com brometo de etídio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta utilizando os padrões moleculares PadBlue *Hind III/XhoI* e DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL).

**Tabela 5. Disposição das temperaturas e tempos utilizados nas reações de PCR**

Amplificação	Temp. desnaturação	Temp. anelamento	Temp. Polimerização	Temp. Extensão
PCV1	94°C/1min.	55°/1 min.	72°/1 min.	72°/10 min.
Capsídeo PCV2	94°C/1min.	55°/1 min.	72°/1 min.	72°/10 min.
Genoma completo	94°C/3min.	50°/1 min.	72°/2 min.	72°/10 min.

#### 4.5. Construção do clone contendo todo o genoma do PCV2

O fragmento de PCR correspondente aos 1768 pb do PCV2 foi clonado utilizando o Kit de clonagem p-GEM- T Easy Vector System I (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante e conforme representado na Figura 3. Posteriormente, células competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , armazenadas a -80°C foram retiradas e descongeladas lentamente no gelo por aproximadamente 30 minutos. Cerca de 4  $\mu\text{L}$  da reação de clonagem foram adicionados a 200 $\mu\text{L}$  de células competentes e mantidas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos. Após o choque térmico, os tubos foram colocados novamente no gelo, 800  $\mu\text{L}$  de SOC

(KCl 250 mM, NaOH 5N, MgCl<sub>2</sub> 2 M , Glicose 1 M) foram adicionados e os tubos pré-aquecidos a 37°C. A solução foi incubada a 37°C por 60 minutos a 150 rpm de agitação. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio seletivo (LB/ampicilina/X-gal/IPTG) e incubadas a 37°C durante a noite. Colônias brancas foram selecionadas como positivas e as colônias azuis foram discriminadas por não haver recombinação.

#### **4.6. Construção do clone contendo a seqüência senso da cápside viral do PCV2**

Quarenta µL do fragmento de PCR de 722 pb, correspondente à amplificação de todo segmento genômico da cápside viral e 40 µL do vetor de expressão em mamíferos pCI-neo (PROMEGA) foram digeridos separadamente em microtubos de 0,6mL, contendo 1,5 µL (15U) da enzima de restrição *MluI* (PROMEGA), 5 µL de solução salina 10X (Tris-HCl 60 mM, NaCl 1,5 M, MgCl<sub>2</sub> 60 mM e DTT 10 mM), 0,5 µL de soroalbumina bovina e 3 µL de água estéril (MILLIQ) durante 14 horas a 37°C. Posteriormente, cada reação foi purificada utilizando o “Kit GFX PCR and DNA purification” (AMERSHAN BIOSCIENCES) e ressuspendida em 40 µL de água estéril (MILLIQ), seguindo as recomendações do fabricante. Trinta e cinco µL das reações acima foram digeridas com 0,5 µL (5U) de *NheI* (AMERSHAN BIOSCIENCES), 5 µL de solução salina 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 100m, DTT 10 mM e NaCl 500 mM) e 9,5 µL de água estéril (MILLIQ) a 37°C. Após 14 horas, foram adicionados 3 µL (3U) de fosfatase alcalina (PROMEGA) ao vetor e a reação novamente incubada a 37°C por 60 minutos. Cada reação de clivagem foi novamente purificada utilizando o “Kit GFX PCR and DNA purification” (AMERSHAN BIOSCIENCES), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1% (GIBCOBRL) e suas



concentrações estimadas. As reações de ligação foram feitas utilizando 2  $\mu\text{L}$  (100 ng) do fragmento de PCR, 0,5  $\mu\text{L}$  (50 ng) do DNA plasmidial, 1  $\mu\text{L}$  de solução salina 10X (Tris-HCl 300 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, DTT 100 mM e ATP 10 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  (1U) da enzima ligase (PROMEGA) e 6  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ) durante 14 horas a 4°C. As reações de transformações bacterianas seguiram os mesmos passos descritos no item 4.6, porém as placas usadas continham somente (LB/ampicilina), com ausência de X-gal e IPTG. Este clone foi denominado pCIneo/capsídeoPCV2, conforme mostrado na Figura 3.

#### **4.7. Triagem bacteriana por PCR**

Este procedimento foi realizado com a finalidade de isolar colônias transformadas recombinantes com o vetor pCIneo/capsídeoPCV2, uma vez que o vetor pCIneo não possui nenhum marcador de recombinação.

Utilizando palitos estéreis, colônias individuais foram coletadas da placa de transformação para outra placa seletiva LB/Amp., com posição numerada e o mesmo palito depositado na placa foi colocado em contato com uma solução de PCR que continha água estéril (MILLI Q), consistindo de Tris-Cl 10 mM, pH 9,0 a 25°C (GIBCOBRL), KCL 50 mM (GIBCOBRL),  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM (GIBCOBRL), 0,2 mM de cada um dos dNTPs (GIBCOBRL), 0,3 M de cada oligonucleotídeo (INVITROGEN) e Taq DNA polimerase 2,5 U/ $\mu\text{L}$  (PHT) em solução final de 25  $\mu\text{L}$ . Para esta reação foram empregados os mesmos oligonucleotídeos utilizados na construção do plasmídeo contendo a seqüência codificadora do capsídeo viral. Cada tubo de PCR continha 10 diferentes colônias bacterianas. Após o término das reações, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (GIBCOBRL) e corados em solução de brometo de etídio (SIGMA). De acordo com o resultado encontrado, novas reações de PCR foram realizadas para selecionar as colônias positivas.

#### 4.8. Minipreparação e preparação em larga escala de DNA plasmidial

As colônias bacterianas positivas foram repicadas em 2 mL de meio LB contendo ampicilina 50mg/mL e mantidas durante à noite sob agitação (180rpm) a 37°C. Um volume de 1,5 mL da suspensão de células foi aliqotado em microtubos de 2mL, centrifugados a 5.000 g por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, 200 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, glicose 50 mM) foram adicionados ao “pellet” celular e a mistura agitada. Em seguida, foram adicionados 4 µL de lisozima 50 mg/mL (SIGMA) e a mistura incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. À mistura, foram acrescentados 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) preparada no momento da extração. Os tubos foram invertidos lentamente por 6 vezes e mantidos no gelo por no máximo 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução III (CH<sub>3</sub>COOK 3M, ácido acético 2M) gelada. Cada tubo foi invertido lentamente por 6 vezes e mantidos por 5 minutos no gelo. A solução foi centrifugada a 12000 g por 3 minutos e 550 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos. Foram adicionados 5 µL de RNase A 10 µg/µL (SIGMA) a cada tubo e mantidos a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 550 µL de fenol:clorofórmio (1:1) foram acrescentados, os tubos invertidos lentamente por cerca de 5 minutos e a solução centrifugada a 12000 g por 5 minutos. O passo anterior foi novamente repetido e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Um volume de 550 µL de isopropanol gelado foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram invertidos lentamente, mantidos por 10 minutos a -70°C e centrifugados a 12.000 g por 5 minutos. Após a centrifugação, os tubos foram invertidos sobre papel toalha por aproximadamente 30 minutos. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol (70%) e centrifugado a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura

ambiente por aproximadamente 30 minutos. Vinte  $\mu\text{L}$  de água estéril foram adicionados ao precipitado. A preparação plasmidial foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL), corado com brometo de etídio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta.

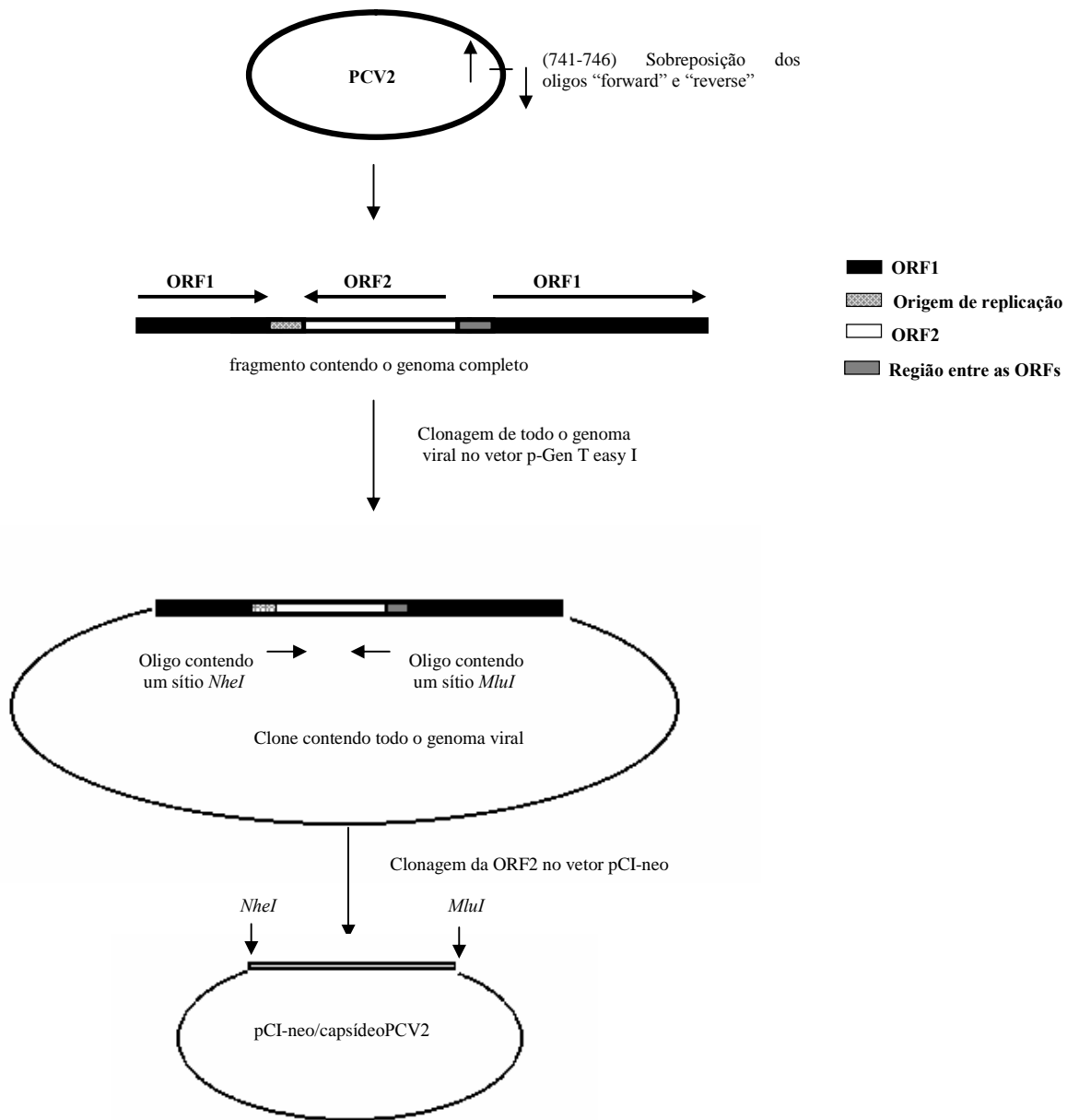
A produção de DNA plasmidial em larga escala foi realizada utilizando o “Kit Plasmid Purification Handbook” (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Este procedimento foi utilizado para purificar DNAs plasmidiais do pCIneo/capsídeoPCV2 em maior quantidade para ser utilizado nas reações de transfecção em células SK6.

#### **4.9. Análise de restrição de DNAs plasmidiais**

Cinco  $\mu\text{L}$  do clone contendo toda a seqüência do PCV2 foram digeridos utilizando 0,2  $\mu\text{L}$ (1U) da enzima *EcoRI* (INVITROGEN), 2  $\mu\text{L}$  de solução salina 10X (TRIS-HCl 500 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, DTT 10 mM e NaCl 1000 mM) e 12,8  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ) a 37°C durante 60 minutos.

O clone (pCIneo/capsídeoPCV2) foi digerido por enzimas de restrição em dois ensaios. No primeiro ensaio, 0,2  $\mu\text{L}$  (1U) da enzima *XbaI* (INVITROGEN) foram adicionados a uma solução contendo 4  $\mu\text{L}$  do vetor, 2  $\mu\text{L}$  de solução salina 10X (Tris-HCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, DTT 10 mM e NaCl 500 mM), 13,8  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ) e a solução incubada por 60 minutos a 37°C. No segundo ensaio, 10  $\mu\text{L}$  do vetor foram clivados primeiramente com 0,5  $\mu\text{L}$  (5U) da enzima *NheI* (AMERSHAN BIOSCIENCES), 5  $\mu\text{L}$  de solução salina 10X (Tris-HCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, DTT 10 mM e NaCl 500 mM) e 4,5  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ) a 37°C por 14 horas. Em seguida, esta reação foi purificada utilizando o “Kit GFX PCR and DNA purification” (AMERSCHAN BIOSCIENCES), seguindo as recomendações do

fabricante e ressuspendida em 20  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ). Em um segundo momento, 1,5  $\mu\text{L}$  (15U) da enzima de restrição *MluI* (PROMEGA) foram adicionados à solução de DNA purificada contendo 5  $\mu\text{L}$  de solução salina 10X (Tris-HCl 60 mM, NaCl 1,5 M,  $\text{MgCl}_2$  60 mM e DTT 10 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de soroalbumina bovina, 23  $\mu\text{L}$  de água estéril (MILLIQ) e mantidas durante 14 horas a 37°C. Dez  $\mu\text{L}$  de cada reação de clivagem foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL), corado com brometo de etídio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta utilizando o padrão DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL).



**Figura 3. Representação esquemática da estratégia de obtenção de plasmídeos recombinantes. (A) Clone contendo todo o genoma viral. (B) Clone contendo a seqüência de nucleotídeos do capsídeo viral.**

#### 4.10. Transfecção de células SK6 via lipofectamina

Um frasco de 25 cm<sup>2</sup> de células SK6 semiconfluentes, contendo aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células livres de PCV1 e PCV2, testadas por PCR, foram repassadas a uma placa de 6 poços de 35 mm de diâmetro, incubadas em estufa de 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, onde cada poço já havia atingido cerca de 90 a 95% de confluência celular, as soluções de uso foram preparadas. Uma solução A foi preparada contendo 50 µL de DNA/ pCIneo/capsídeoPCV2 (20 µg) e 1.250 µL de Opti-MEM (SIGMA) e uma solução B contendo 50 µL de lipofectamina (Lipofectamine<sup>TM</sup> INVITROGEN) e 1.250 µL de Opti-MEM (SIGMA), sendo ambas as soluções incubadas separadamente à temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, a solução A foi adicionada à solução B, misturada gentilmente e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

As placas contendo a monocamada de células SK6 foram lavadas uma vez com 500µL de opti-MEM (SIGMA) e, posteriormente, 500 µL de opti-MEM (SIGMA) e SFB 1 % (CULTILAB) foram adicionados em cada poço.

Um volume de 500 µL do complexo lipofectamina/DNA foi transferido para 5 poços da placa, deixando um poço como controle do ensaio. A placa foi novamente incubada em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Após 24 horas, as células foram analisadas por imunofluorescência como descrito no item 4.11.

#### **4.11. Ensaios de imunofluorescência indireta (IFI)**

Células SK6 infectadas com PCV2 e células SK6 livres foram utilizadas nos ensaios de IFI como controles positivo e negativo, respectivamente. As células SK6 transfectadas com o plasmídeo pCIneo/capsídeoPCV2 foram tripsinizadas após 24 horas de incubação e, em seguida, adicionadas em 3,6 mL de uma solução contendo MEM e soro fetal bovino 10% e fixadas por 2 horas em lâminas de imunofluorescência com acetona resfriada. Após fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e água destilada. Em seguida, 20 µL de soro policlonal monoespecífico hiperimune anti-PCV (VMRD, Inc.) diluído 1:50 em PBS foram adicionados em cada orifício da lâmina e incubados a 37°C por uma hora. As células foram novamente lavadas duas vezes com PBS e água destilada e imunocoradas com 20 µL do anticorpo secundário de coelho anti-suíno conjugado com FITC (diluído 1:10 em PBS) por 30 min a 37°C. Após a lavagem com PBS e água destilada, foram adicionados 2 µL de Anti-Fad. As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Eclipse E600 - NIKON) com o objetivo de se detectar a presença da coloração fluorescente específica.

#### **4.12. Determinação da seqüência de nucleotídeos**

As amostras de DNAs plasmidiais e os produtos de PCR foram purificados utilizando o “Kit GFX<sup>TM</sup> PCR and DNA Purification ” (AMERSHAM BIOSCIENCES), seguindo as recomendações do fabricante e, em seguida, enviadas ao Laboratório de Análises Genéticas/BIOAGRO/UFV para posterior sequenciamento. O sequenciamento foi realizado utilizando o “ABI PRISM BigDie III Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (APPLIED BIOSYSTEMS) no sequenciador automático “ABI PRISM 377 Genetic Analyser” (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações de sequenciamento

foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) descrita por SANGER *et al.* (1977).

#### **4.13. Análises das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos**

As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com as seqüências de PCV2 relacionadas no GenBank (Tabela 6), utilizando o programa “Basic Alignment Search Tool” (BLAST), disponível no endereço “National Institute of Health-NCBI” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando o programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustal](http://www.ebi.ac.uk/clustal)). A partir dos alinhamentos múltiplos foram preparados agrupamentos genéticos utilizando o programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA) versão 3.0 Windows ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)), pelo método de *neighbour-joining* com correção Poisson. As análises estatísticas foram realizadas por 2000 *bootstrap*. Estas seqüências foram traduzidas em seqüências de aminoácidos pelo programa DNAMAN. Parâmetros químicos e domínios estruturais relatados nestas seqüências foram verificados utilizando os programas ProtParam e InterPro Scan (<http://ca.expasy.org/tools/#primary>).



**Tabela 6** – Disposição das seqüências do PCV2 e seus respectivos números de acesso ao GenBank.

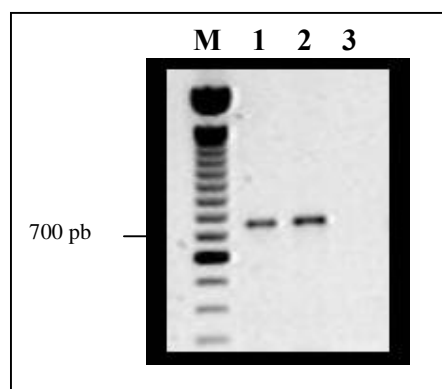
Números de acesso	Vírus/Origens
AY325495	PCV2/África do Sul
AF201307	PCV2/Alemanha
AF201305	PCV2/Alemanha
AF109399	PCV2/Canadá
AF027217	PCV2/Canadá
AF086836	PCV2/Canadá
AF086835	PCV2/Canadá
AY596823	PCV2/China
AY849938	PCV2/China
AY682997	PCV2/China
DQ017036	PCV2/China
AY579893	PCV2/China
AY691169	PCV2/China
AY678532	PCV2/China
AF201310	PCV2/Espanha
AY094619	PCV2/Estados Unidos
AF264042	PCV2/Estados Unidos
AY321994	PCV2/França
AY322004	PCV2/França
AY322000	PCV2/França
AF201311	PCV2/França
AF055394	PCV2/França
AY484416	PCV2/Inglaterra

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento viral e ensaios de PCR

A confirmação da ausência de PCV1 foi checada após cada passagem da cultura de células SK6 para que não houvesse impedimento para a realização dos procedimentos futuros.

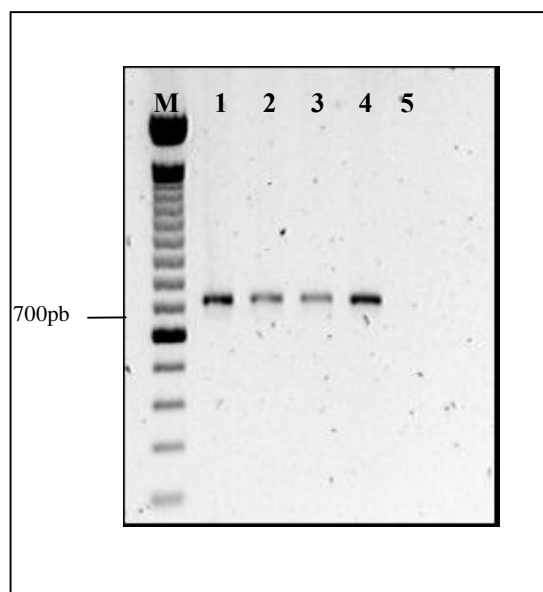
Os oligonucleotídeos utilizados demonstraram ser capazes de detectar o PCV1 em culturas de células PK15 PCV1 (ATCC, CCL-33) (item 4.3.1. e Figura 4) e de confirmar a ausência do vírus nas células SK6 usadas para os ensaios. A Figura 4 apresenta o resultado da amplificação de fragmentos de 740 pb obtidos nos ensaios de PCR.



**Figura 4. Eletroforese em agarose de produtos de PCR.** Linhas 1 e 2 referem-se à amplificação de DNA de PCV1PK15. Linha 3 refere-se à ausência de PCV1 em células SK6 (controle negativo). M, DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL).

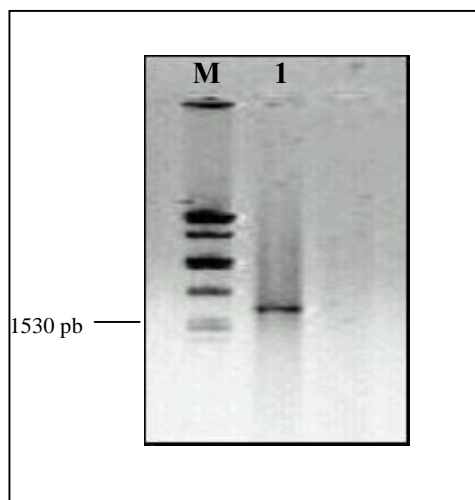
Baseado nos testes de isolamento viral descritos por MONNERAT (2003), o isolamento do PCV2 foi realizado pela inoculação de amostras de tecido em células SK6 e, em seguida, análise por PCR utilizando os

oligonucleotídeos descritos no item 4.3.3. Na Figura 5, pode ser observado o fragmento amplificado de 720 pb do DNA proveniente do isolamento viral, realizado a partir de fragmentos de tecidos renais. O fragmento amplificado foi submetido a reações de sequenciamento e comparado com amostras disponíveis no GenBank. As análises das seqüências confirmaram ser realmente PCV2 (ver item 5.4).



**Figura 5. Eletroforese em geral de agarose de produtos de PCR.** Linhas 1, 2, 3 e 4 referem-se à amplificação de DNA de PCV2SK6. Linha 5 refere-se à ausência de PCV2 em células SK6 (controle negativo). M, DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL).

Após confirmado o isolamento do PCV2 com base nas análises das seqüências, foram utilizados os oligos (item 4.3.2.) para a reação de PCR que amplifica todo o genoma viral. Na Figura 6 é mostrado o genoma do PCV2 amplificado dando origem a um fragmento de 1768 pb.

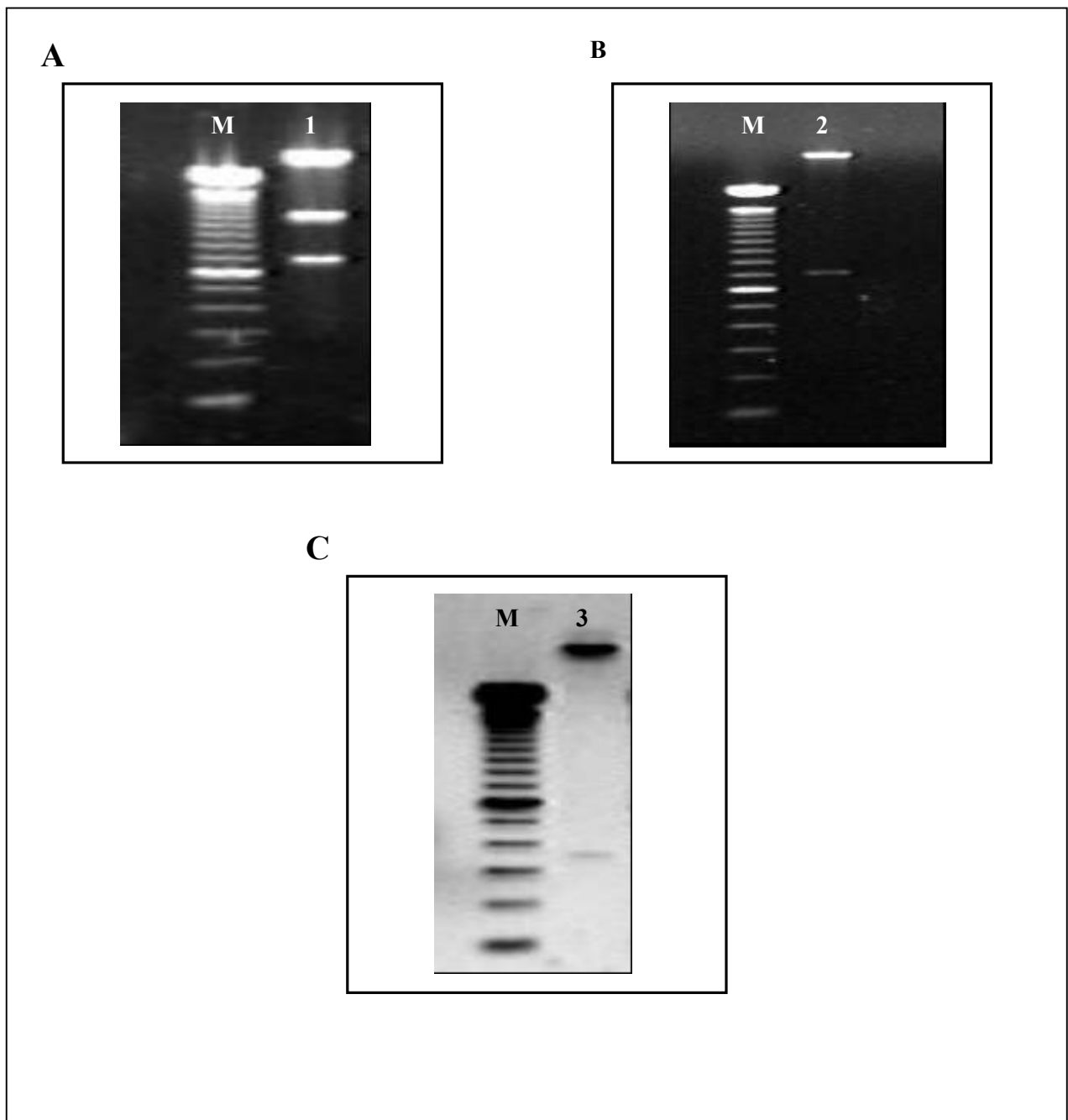


**Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR.** Linha 1 refere-se à amplificação completa do DNA de PCV2. M, PadBlue *HindIII/XhoI*.

## 5.2. Análise de restrição dos plasmídeos

O DNA plasmidial contendo toda a seqüência do PCV2 foi submetido à clivagem com as enzimas *EcoRI* e *ClaI*. O ensaio com a enzima *EcoRI* deu origem a fragmentos de tamanho de 3015, 1096 e 682 pb (Figura 7.A), confirmando o padrão esperado. Porém, na análise dos resultados da reação com a enzima *ClaI*, esta não mostrou ser capaz de originar os fragmentos esperados de 3015 e 1768 pb, mostrando somente a linearização do plasmídeo (dados não mostrados). Embora a enzima não tenha produzido os fragmentos esperados mesmo após várias tentativas, a análise das seqüências de nucleotídeos das extremidades deste clone confirmaram a seqüência de nucleotídeos correspondentes ao sítio da enzima de restrição *ClaI* contendo um sítio de metilação bacteriana que impedia a clivagem esperada (dados mostrados no item 5.4).

O DNA plasmidial contendo a seqüência codificadora do capsídeo viral (pCIneo/capsídeoPCV2) foi submetido a reação de clivagem com as enzimas de restrição *NheI/MluI* e *XbaI*. A digestão com as enzimas *NheI/MluI* originou fragmentos de tamanho de 5470 e 710 pb (Figura 7B). O ensaio com a enzima *XbaI* deu origem a produtos de tamanho de 5790 e 380 pb (Figura 7C). Os tamanhos dos fragmentos obtidos mostraram estar dentro do padrão esperado.

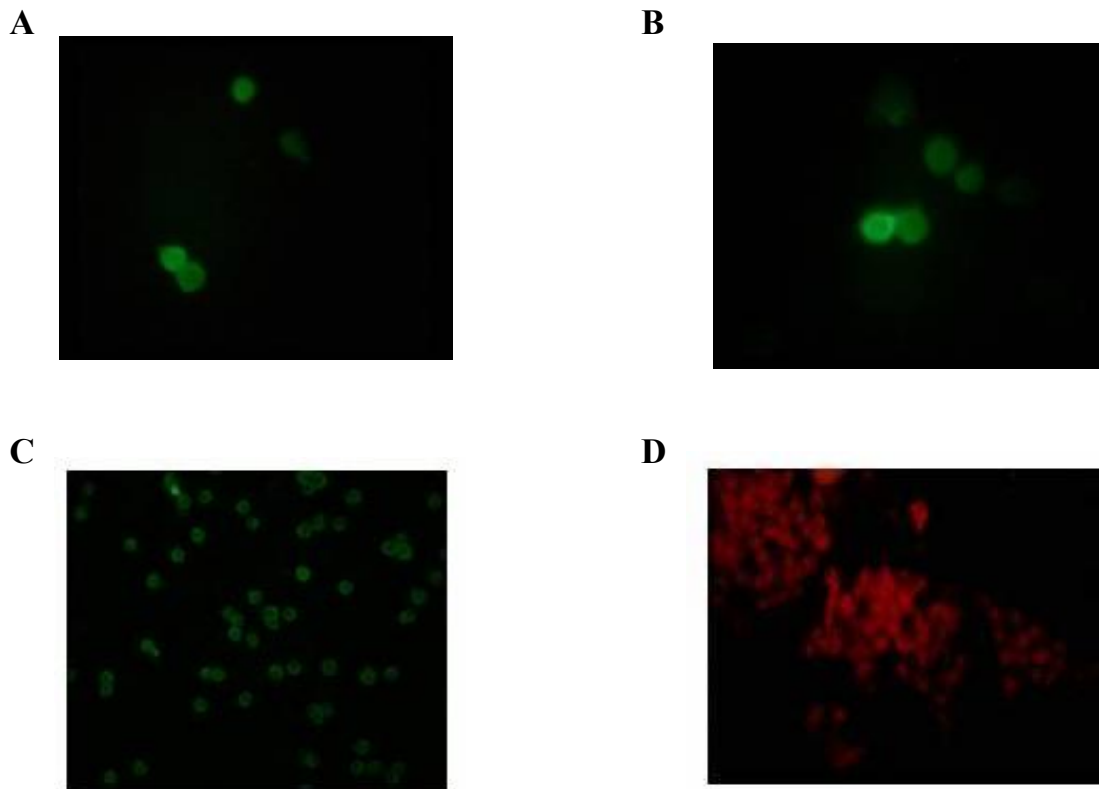


**Figura 7. Eletroforese em gel de agarose de produtos de digestão de plasmídeos.**

M, DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL). (A) Plasmídeo contendo o fragmento correspondente ao genoma do PCV2 clivado com *EcoRI* (linha 1). (B) pCIneo/capsídeoPCV2 clivado com *NheI/MluI* (linha2). (C) pCIneo/capsídeoPCV2 clivado com *XbaI* (linha3).

### 5.3. Expressão da proteína do capsídeo viral em células SK6

Com a finalidade de expressar a proteína do capsídeo viral em células SK6, a ORF2 foi amplificada por PCR e, inicialmente, inserida no vetor de expressão pCI-neo (PROMEGA) (Figura 3). Esta construção de DNA (pCIneo/capsídeoPCV2) foi utilizada nas reações de transfecções em culturas de células SK6 livres de PCV via lipofectamina (Lipofectamine<sup>TM</sup> INVITROGEN). O pCIneo/capsídeoPCV2 apresentou um genoma viável, desde que os transcritos *in vitro* mostraram uma expressão proteica detectada por imunofluorescência indireta (Figura 8). Ensaio de transfecção também foram realizados em células VERO (dados não mostrados) com o intuito de se obter uma maior eficiência de transfecção, porém, assim como as células SK6, as células VERO também revelaram uma baixa eficiência. Entretanto, independente da baixa eficiência de transfecção, a proteína foi expressa pelo pCIneo/capsídeoPCV2. Os resultados encontrados nas células SK6PCV2 (controle positivo) e nas células SK6 livres (controle negativo) confirmaram a padronização correta dos ensaios de imunofluorescência indireta (Figura 8).



**Figura 8. Detecção da expressão de proteína por microscopia de fluorescência. (A)** e **(B)** Células SK6 livres de PCV transfectadas com o pCIneo/capsídeoPCV2 imunocoradas em aumento de 400 X. **(C)** Células SK6PCV2 imunocoradas (controle positivo) em aumento de 100 X. **(D)** Células SK6 livres de PCV contra coradas com azul de Evans 0,01% (controle negativo) em aumento de 100 X.

#### **5.4. Análise de seqüências e construção de agrupamentos genéticos**

Com a finalidade de se confirmar se a cepa isolada no LVMA era realmente o PCV2, o fragmento de tamanho de 720 pb obtido na reação de PCR foi seqüenciado e comparado com amostras disponíveis no GenBank. O alinhamento individual das seqüências apresentou uma identidade que



variou de 96% a 97%. No quadro 01 é mostrada a seqüência de 452 nucleotídeos que corresponde à seqüência parcial do fragmento de 720 pb amplificado por PCR.

```

Fragmento: 452 bp;
Composição: 109 A; 153 C; 90 G; 99 T; 1 OTHER
Porcentagem: 24% A; 34% C; 20% G; 22% T; 0%OTHER

Peso molecular (kDa): ssDNA: 138.35 dsDNA: 278.7
ORIGEM
1 AACACGCCCA CGCAGGCTTT TTGGCCAGAT CCTCCGATCG CGNCCCTGGA CTCGTCCACC
61 CCCGCCATCC GTTACCGCTG GAGAAGGAAA AATGGCATCT TCAACACCCG CCTCTCCCGC
121 ACCTTCGGAT ATACTATCAA ACGAACCACA GTCAAAAGCG CCCTCCTGGG CGGTGGACAT
181 GATGAGACTT CAATATTAAT GACTTTCCTC CCCCAGGAGG GGGCTCAAAC CCCCCTCTG
241 TGCCCTTTGA ATACTACAGA ATAAGAAAGG TTAACGGTTG AATCTGGCC CTGCTCCCCG
301 ATCACCAGG GTGACAGGGG AGTGGGCTCC AGTGCTGTTA TTCTAGATGA TAACTTTGTA
361 ACAAAGGCCA CAGCCCTCAC CTATGACCCC TATGTAACT ACTCCTCCCG CCATACCATA
421 ACCCAGCCCT TCTCCTACCA CTCCCGCTAC TT

```

**Quadro 1. Seqüência parcial de nucleotídeos do PCV2 isolado pelo LVMA.**

Após a confirmação do isolado viral de PCV2, o clone contendo todo o fragmento do genoma do vírus (FLC) foi construído e, em seguida, foi confirmado por análise de restrição enzimática (item 5.2) e por sequenciamento. No Quadro 2 pode ser observada a seqüência de nucleotídeos correspondente ao sítio de clivagem da enzima de restrição *ClaI* e seqüência de nucleotídeos de metilação bacteriana.

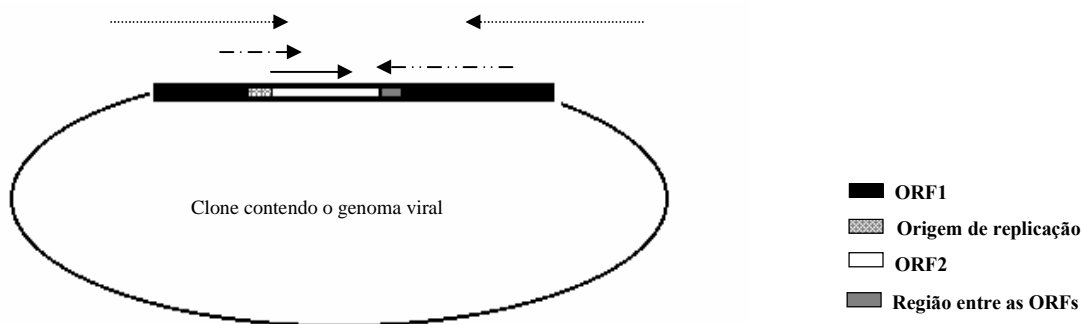
O sequenciamento do clone contendo todo o genoma viral foi realizado utilizando primeiramente os oligonucleotídeos universais que anelam no vetor (M13 “forward” e M13 “reverse”). Para as regiões mais internas do genoma viral foram utilizados os oligonucleotídeos apresentados no item 4.3.4. e o oligonucleotídeo RCAP “forward” (ver item 4.3.3.). Na representação esquemática da Figura 9 é mostrada a estratégia utilizada para a obtenção das seqüências. Até o momento foi

possível obter o sequenciamento completo da ORF1 e o sequenciamento parcial da ORF2, onde 468 pb dos 702 pb foram seqüenciadas.

(A)  
**ATTCGATTC**CATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTG  
 TACCTTTTTTGGCCCGGAGTATTCTGATTACGAGCAATCAGACCCCGTT

(B)  
**AATTCGCC**CCATCGATCCACACAGTCTCAGTAGATCGTCCAGGGCCAGC  
 CAGCATAAAAGTCATCAATAACAACCACTTCTTCACCATGGTAACCATC

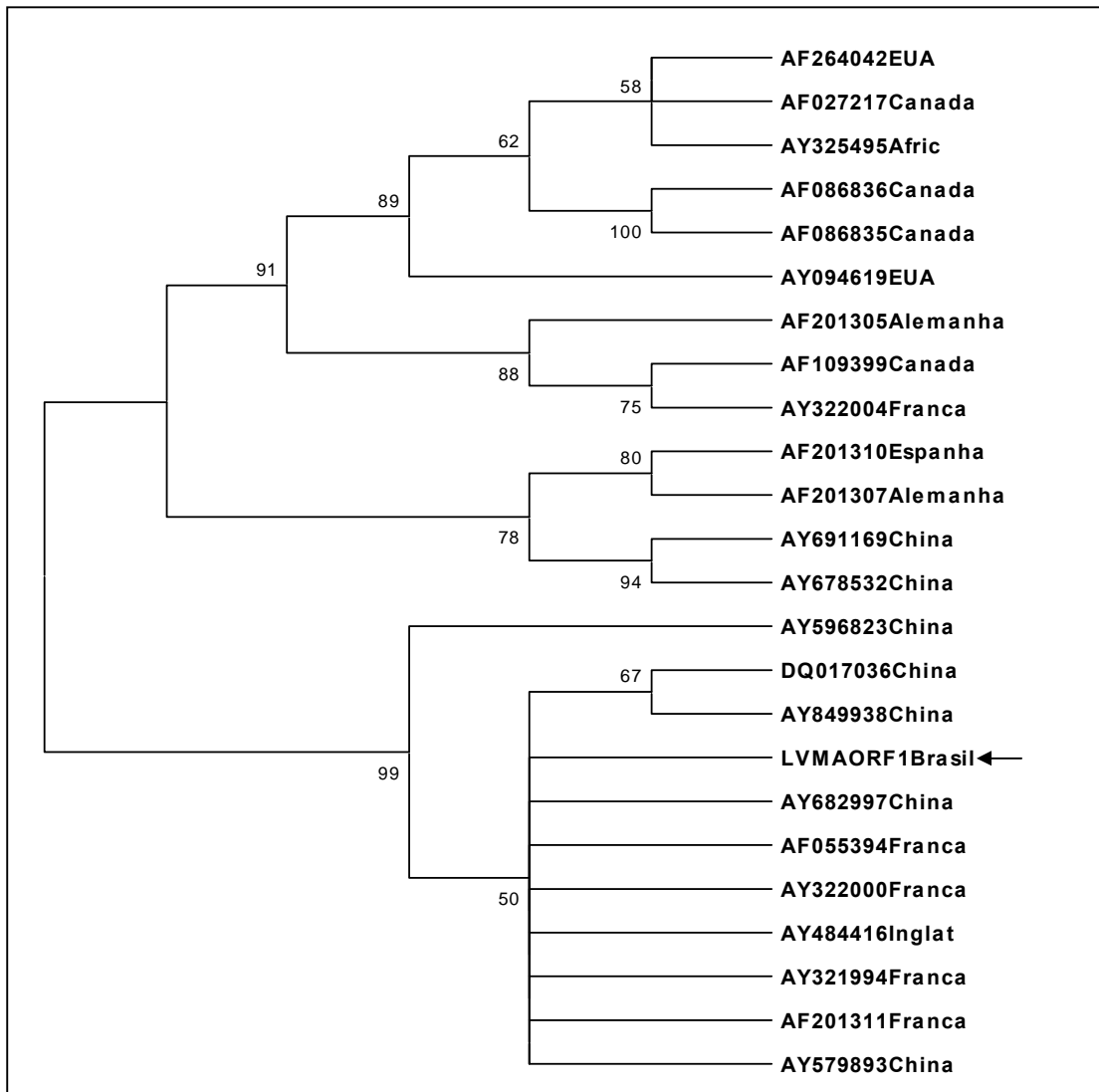
**Quadro 02. Seqüência parcial de nucleotídeos de cada extremidade do clone contendo todo o genoma viral. (A) e (B) Seqüências obtidas com os oligonucleotídeos M13 “forward” e M13 “reverse”. As seqüências de nucleotídeos pertencentes ao vetor encontram-se em vermelho. As bases degeneradas adicionadas encontram-se em azul. As seqüências de nucleotídeos dos oligonucleotídeos que amplificam o PCV2 encontram-se em cinza, onde o sítio de clivagem da enzima de restrição *ClaI* encontra-se sublinhado. Na Figura B encontra-se a seqüência alvo de metilação da enzima *Dam* metilase em verde. As seqüências de nucleotídeos correspondentes ao PCV2 encontram-se em negrito.**



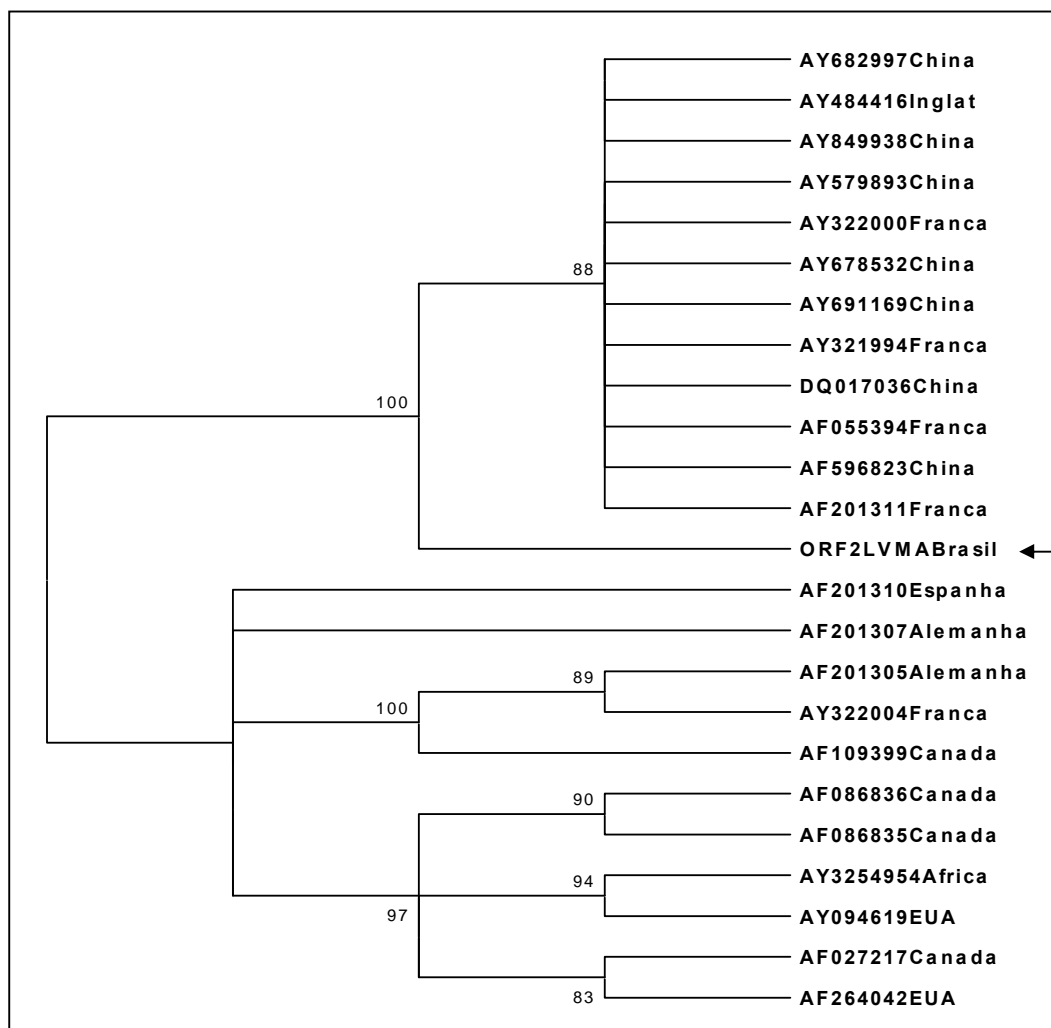
**Figura 9. Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do clone contendo o fragmento completo do genoma viral.** (.....) representa a seqüência obtida com a utilização dos oligos M 13. (---) representa a seqüência obtida com a utilização do oligo F426. (—) representa a seqüência obtida com a utilização do oligo RCAP. (·---) representa a seqüência obtida com a utilização do oligo R516.

A análise da seqüência de nucleotídeos da ORF1 e da seqüência parcial da ORF2 do isolado encontrado pelo LVMA mostrou, respectivamente, 99,27% e 97,99% de identidade com as seqüências referidas na Tabela 6.

Os agrupamentos genéticos baseados na seqüência de nucleotídeos da ORF1 e na seqüência parcial da ORF2 são apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Na Figura 10, pode-se observar que a seqüência de nucleotídeos do isolado LVMA está em grupos diferentes de isolados já caracterizados na américa, agrupando-se com seqüências de isolados europeus e asiáticos. Já na Figura 11, é possível verificar que a seqüência parcial de nucleotídeos da ORF2 do PCV2/LVMA mostra se posicionar num braço distinto não observado na análise da seqüência da ORF1.



**Figura 10. Agrupamento genético baseado na seqüência de nucleotídeos da ORF1 do PCV2/LVMA.** O comprimento da barra horizontal dos grupos é proporcional à distancia genética entre os isolados. Os números sobre os grupos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas. A posição do isolado PCV2/LVMA é indicada pela seta.



**Figura 11. Agrupamento genético baseado na seqüência parcial de nucleotídeos da ORF2 do PCV2/LVMA.** O comprimento da barra horizontal dos grupos é proporcional à distancia genética entre os isolados. Os números sobre os grupos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas. A posição do isolado PCV2/LVMA é indicada pela seta.

A partir da análise das seqüências de nucleotídeos da ORF1 e ORF2 pelo programa DNAMAN foi possível obter a seqüência completa de aminoácidos codificada pela ORF1 (Figura 12) e a seqüência parcial de

aminoácidos codificada pela ORF2 (Figura 13). Nenhum ponto de mutação capaz de produzir formas truncadas das proteínas foi detectado.

Tradução da seqüência da ORF1	
Códon Universal	
Número de aminoácidos: 314, MW=35643	
ORF: 1-942, 314 AA, MW=35643	
1	ATGCCAGCAAGAAGAATGGAAGAAGCGGACCCCCACCCACAAAAGGTGGGTGTTCACT
1	M P S K K N G R S G P P P H K R W V F T
61	TTGAATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTT
21	L N N P S E D E R K K I R D L P I S L F
121	GATTATTTTATGTGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGG
41	D Y F I V G E E G N E E G R T P H L Q G
181	TTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCAGACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGC
61	F A N F V K K Q T F N K V K W Y L G A R
241	TGCCACATCGAGAAAGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAA
81	C H I E K A K G T D Q Q N K E Y C S K E
301	GGCAACTTACTGGTGGAGTGTGGAGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCT
101	G N L L V E C G A P R S Q G Q R S D L S
361	ACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGGCCGTTGCAGAGCAGCACCT
121	T A V S T L L E S G S L V A V A E Q H P
421	GTAACGTTTGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAGTGAAGCGGAAAATG
141	V T F V R N F R G L A E L L K V S G K M
481	CAGAAGCGTGATTGGAAGACTAATGTACACGTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAA
161	Q K R D W K T N V H V I V G P P G C G K
541	AGCAAATGGGCTGCTAATTTTGCAGACCCGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAAC
181	S K W A A N F A D P E T T Y W K P P R N
601	AAGTGGTGGGATGGTTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGG
201	K W W D G Y H G E E V V V I D D F Y G W
661	CTGCCCTGGGACGATCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGATTGTAGAGACTAAA
221	L P W D D L L R L C D R Y P L I V E T K
721	GGTGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACGAGCAATCAGACCCCGTTG
241	G G T V P F L A R S I L I T S N Q T P L
781	GAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAGCTCTTTATCGGAGGATTACTTCC
261	E W Y S S T A V P A V E A L Y R R I T S
841	TTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTCGTCACC
281	L V F W K N A T E Q S T E E G G Q F V T
901	CTTTCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGA
301	L S P P C P E F P Y E I N Y *

**Figura 12. Seqüência de aminoácidos da replicase viral.** Disposição das seqüências obtidas pelo programa DNAMAN.

Tradução da seqüência parcial da ORF2.  
 Códon Universal  
 Número de aminoácidos: 156, MW=17970  
 ORF: 1-468, 156 AA, MW=17970

```

1      GACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTGAATACTACAGA
1      D F L P P G G G S N P R S V P F E Y Y R

61     ATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGTGACAGGGGA
21     I R K V K V E F W P C S P I T Q G D R G

121    GTGGGCTCCAGTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTCAC
41     V G S S A V I L D D N F V T K A T A L T

181    TATGACCCCTATGTAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCAC
61     Y D P Y V N Y S S R H T I T Q P F S Y H

241    TCCCGTTACTTTACCCCCAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAAG
81     S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N

301    AACAAAAGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGC
101    N K R N Q L W L R L Q T A G N V D H V G

361    CTCGGCACTGCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATG
121    L G T A F E N S I Y D Q E Y N I R V T M

421    TATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAAACCCCTAA
141    Y V Q F R E F N L K D P P L K P *
```

**Figura 13. Seqüência parcial de aminoácidos da capsíde viral.** Disposição das seqüências obtidas pelo programa DNAMAN.

A sequênciade aminoácidos da ORF1 obtida no item 4.13. foi avaliada quanto aos parâmetros químicos, mostrando possuir um ponto isoelétrico (PI) de 8,4, uma massa molecular de 35.701,4, uma fórmula estrutural de  $C_{1615}H_{2467}N_{437}O_{465}S_8$  e um número de aminoácidos com cargas positivas e negativas de 40 e 37, respectivamente. A análise de domínios putativos da sequênciade aminoácidos da ORF1 do PCV2/LVMA mostrou uma identidade com outros domínios putativos de outras proteínas virais. O principal domínio putativo foi associado à família das replicases de circovírus animais e de vírus vegetais. Outros domínios putativos encontrados baseados na sequênciade analisada mostraram uma associação com domínios de ligação a origem de replicação (“RBP-

Like”), RNA helicase e com uma poliproteína de Calicivírus que apresenta função de helicase, de polimerase e de peptidase.



## 6. DISCUSSÃO

A circovirose suína é uma doença emergente em plantéis de todo mundo. Atualmente, é uma das moléstias de suínos mais importante causada por um agente infeccioso. Anualmente são descritos casos novos de ocorrência da doença por várias partes do país e do mundo. As evidências até agora sugerem que a infecção de suínos com PCV2 pode ocorrer sem o aparecimento da doença (SEGALÉS *et al.*, 2004).

A infecção causada pelo PCV2 possui um grande espectro de manifestações clínicas que vão desde a síndrome da refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS), a síndrome nefropática e dermatológica suína (PDNS), pneumonia necrotizante proliferativa (PNP), tremor congênito (TC) e falhas reprodutivas (ALLAN & ELLIS, 2000).

Pouco se sabe sobre o controle das doenças relacionadas ao PCV2. Este vírus é altamente resistente à inativação por detergentes e desinfetantes comuns, tornando o processo de descontaminação da granja mais difícil. Atualmente, nenhum método vacinal é disponível para o controle da doença. Em face da elevada ocorrência da doença aliada à falta de um controle profilático vacinal, faz-se necessário produzir em caráter de urgência uma vacina contra a circovirose suína, visto que o único método correntemente utilizado na prevenção desta enfermidade é a adequação das práticas de manejo.

Com a introdução da tecnologia do DNA recombinante, tem sido desenvolvido uma nova geração de vacinas baseadas em vírus reconstruídos. Esta nova vacina iria eliminar os riscos associados com o isolamento de grandes quantidades de vírus infecciosos e impedir a produção de vacinas inativadas inapropriadamente. Estas novas tecnologias permitem o conhecimento do (s) fragmentos (s) genômico (s) que são

responsáveis pela patogenicidade. Estes podem ser transferidos, removidos ou modificados, e usados para construir vírus modificados.

As vacinas de DNA consistem de um plasmídeo bacteriano, contendo seqüências de nucleotídeos que expressam uma proteína antigênica e seqüências que permitem a expressão gênica em células eucariotas e procariotas. Este método vacinal pode estimular os diferentes tipos de resposta celular e humoral (ULMER *et al.*, 1996).

Dentre os benefícios da utilização de vacinas de DNA recombinantes está a vantagem que o próprio DNA vacinal pode atuar como um adjuvante pela presença de seqüências específicas no DNA ricas em motivos não metilados CpG. Estes motivos funcionam como indutores na resposta Th1, induzindo a atividade de IL-12, IL-6 e IFN- $\gamma$  (KOFTA, 2001).

Este trabalho nos permitiu construir um plasmídeo recombinante com o potencial de produzir “in vivo” um antígeno vacinal (pCIneo/capsídeoPCV2) dentro dos padrões de uma vacina de DNA recombinante. Este candidato vacinal foi analisado com relação à sua capacidade de expressar uma proteína *in vitro*. A seqüência codificadora da proteína do capsídeo viral foi escolhida como parte recombinante do plasmídeo pCI-neo (PROMEGA). Estudos realizados por BLANCHARD *et al.* (2003) mostraram que testes vacinais utilizando o sistema do pcDNA 3.1 (INVITROGEN) e pVL1393 (PHARMIGEN) recombinados à ORF2 constituíram o principal imunógeno indutor de proteção em suínos desafiados com PCV2, quando comparado à proteção induzida nas vacinações com plasmídeos contendo a ORF1.

LEKCHAROENSUK *et al.* (2004) produziram versões truncadas da proteína da cápside viral, as quais mostraram que apenas três regiões (correspondentes aos resíduos de aminoácidos de 47 a 63, 165 a 200 e os quatro últimos aminoácidos do terminal carboxílico) da proteína formam epitopos conformacionais reconhecidos por anticorpos monoclonais.

ZHOU *et al.* (2005) também verificaram o potencial antigênico de uma proteína truncada da capsídeo viral. Estes autores construíram um plasmídeo recombinante contendo somente 579 pb da seqüência codificadora do capsídeo viral, e pela expressão em *E. coli*, conseguiram eliminar os primeiros 47 resíduos de aminoácidos no terminal amínico. Estes defenderam o potencial desta forma truncada da proteína viral como antígeno vacinal, porém, ainda não foi verificada *in vivo* a capacidade imunoreativa desta forma protéica.

KAMSTRUP *et al.* (2004) utilizando uma estratégia semelhante à empregada no presente trabalho, expressaram a proteína do capsídeo viral *in vitro* e, posteriormente, promoveram estudos de vacinação via “gene gun” em camundongos com esse plasmídeo recombinante produtor de antígeno vacinal. Esses autores verificaram o potencial antigênico desta construção pela detecção de aumentos crescentes nos títulos de anticorpos anti-PCV2 dos animais vacinados. Acreditamos que novas construções vacinais possam ser produzidas a partir do nosso plasmídeo recombinante (pCIneo/capsídeoPCV2), assim como a utilização de diferentes vias de inoculação, métodos de avaliação da resposta imune, períodos de vacinação e desafios dos animais possam ainda ser estudados para melhorar o desempenho vacinal.

A comparação da seqüência de nucleotídeos da ORF1 e da seqüência parcial da ORF2 com demais seqüências de PCV2 disponíveis no GenBank mostrou uma alta identidade (99,27% e 97,99%, respectivamente). Semelhante aos resultados encontrados por nós, LAROCHELLE *et al.* (2002) encontraram valores de identidade de 97-100% e 93-100% na seqüência de nucleotídeos da ORF1 e ORF2, respectivamente, quando analisaram 34 amostras virais de PCV2

Neste trabalho, assim como nos estudos descritos por FENAUX *et al.* (2000); HAMEL *et al.* (2000) e MANKERTZ *et al.* (2000) foi

encontrado que a seqüência de nucleotídeos da ORF2 possui uma maior variação nucleotídica comparada a ORF1. As discretas alterações na seqüência de nucleotídeos da ORF2 entre os diferentes isolados analisados sugerem uma ligação entre a proteína do capsídeo e a patogenicidade do PCV2. Modificações nesta proteína podem alterar os determinantes envolvidos no tropismo tecidual ou nas interações vírus-hospedeiro. Embora nenhum experimento tenha sido conduzido para determinar se as diferenças nas seqüências da cápside contribuem efetivamente para as propriedades patogênicas do PCV-2, esta hipótese permanece como uma possibilidade interessante que pode explicar o mecanismo básico de patogenia mediada pelo PCV-2 nos seus hospedeiros. Mesmo com a presença de uma pequena alteração na seqüência codificadora do capsídeo viral entre os isolados, de uma maneira geral, pode-se afirmar que esta região possui uma seqüência conservada, que favorece o estudo e a construção de agentes vacinais para o controle da circovirose suína.

MEEHAN *et al.* (2001), ao estudarem quatro isolados de PCV2 associados a casos de PMWS, PDNS e fetos abortados, encontraram uma diferença mínima na seqüência de nucleotídeos, que provavelmente está relacionada à origem geográfica de cada isolado. Diferente dos achados encontrados por MEEHAN *et al.* (2001), a análise dos agrupamentos genéticos mostrou que o nosso isolado não possui uma relação com base na origem geográfica, uma vez que este foi agrupado com os isolados asiáticos e europeus e não com os isolados norte americanos e canadenses (Figuras 9 e 10). O mesmo foi encontrado por LAROCHELLE *et al.* (2002) quando, ao analisarem a seqüência de nucleotídeos de 34 isolados do Canadá, verificaram que estes isolados não possuíam uma associação com bases nas suas origens geográficas.

O estudo da evolução, da diversidade genética do PCV2 e da existência de variantes é importante para o melhor entendimento da

patogênese das síndromes emergentes desencadeadas por este vírus e, ao mesmo tempo, para garantir o desenvolvimento de medidas profiláticas. Estudos moleculares para determinar a extensão das variações genéticas do PCV2 têm sido limitados (FENAUX et al., 2000; HAMEL et al., 2000; MEEHAN et al., 2001). É necessário que um maior número de pesquisas focadas na caracterização de seqüências do PCV2 seja realizado para melhor relacionar as diferenças estruturais com as várias síndromes causadas por este agente.

Embora até o presente momento não se tenha encontrado diferenças genéticas entre os isolados causadores de doença clínica e aqueles encontrados em animais sadios, não podemos descartar a hipótese de que pequenas diferenças genéticas são as responsáveis em conferir a patogenicidade do PCV2. Baseado neste raciocínio, o DNA utilizado para construir o pCIneo/capsídeoPCV2 foi extraído de um isolado de PCV2 patogênico proveniente de amostras de tecido renal previamente confirmadas por análise histológica. Esta análise mostrou lesões semelhantes às lesões encontradas em casos de PDNS descritos por SEGALÉS *et al.*(2004).

Os resultados obtidos nesse trabalho serão de grande importância para o início de estudos de vacinações em modelos animais, uma vez que foi demonstrado o potencial de expressão *in vitro* da proteína da cápside viral pelo plasmídeo recombinante. A construção do clone contendo toda a seqüência de nucleotídeos do PCV2 será de grande valor para futuros estudos de manipulações genéticas e novas construções vacinais.

## 7. CONCLUSÕES

- O sequenciamento completo da ORF1 do isolado de PCV2 mostrou uma identidade de nucleotídeos de 99,27% quando comparado com as seqüências de nucleotídeos da ORF1 disponíveis no GenBank;
- O sequenciamento parcial da ORF2 do isolado de PCV2 mostrou uma identidade de nucleotídeos de 97,99% quando comparado com as seqüências de nucleotídeos da ORF2 disponíveis no GenBank;
- A análise dos agrupamentos genéticos baseados na seqüência completa de nucleotídeos da ORF1 e na seqüência parcial de nucleotídeos da ORF2 mostrou que o PCV2/LVMA se encontra associado principalmente com seqüências européias e asiáticas, distanciando-se das seqüências norte americanas;
- Os ensaios de imunofluorescência indireta mostraram que o plasmídeo pCIneo/capsídeoPCV2 transfectado em células SK6 foi capaz de expressar a proteína do capsídeo viral *in vitro*;
- O plasmídeo contendo a seqüência codificadora do capsídeo viral mostrou ser um antígeno candidato a estudos futuros de vacinação em animais;
- A construção do clone contendo toda a seqüência de nucleotídeos do PCV2 será de grande valor para estudos

futuros de manipulações genéticas e novas construções vacinais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN GM; MCNEILLY F; FOSTER C & ADAIR BM 1994a. Infection of leucocyte cell cultures from different species with porcine circovirus. *Veterinary Microbiology* 41:267-279.

ALLAN GM; PHENIX KV; TODD D & MCNULTY MS 1994b. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine* 41:17-26.

ALLAN GM; KENNEDY S; MCNEILLY F; FOSTER JC; ELLIS JA; KRAKOWKA SJ; MEEHAN BM; ADAIR BM. 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 121:1-11.

ALLAN GM; MCNEILLY F; CASSIDY JP; REILLY GAC; ADAIR B; ELLIS WA & MCNULTY MS 1995. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrums deprived piglets and examinations of pig fetal material. *Veterinary Microbiology* 44:49-64.

ALLAN GM & ELLIS JA 2000. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:3-14.

ALLAN GM; MCNEILLY F; MEEHAN B; KENNEDY S; JOHNSTON D; ELLIS J; KRAKOWKA S; FOSSUM C; WATTRANG E; WALLGREN P 2002. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Veterinary Record* 150:255-256.



BASSAMI MR; BERRYMAN D; WILCOX GE & RAIDAL SR 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotides sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plants circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology* 249:453-459.

BLANCHARD P; MAHÉ D; CARIOLET R; KERANFLEC'H A; BAUDOUART MA; CORDIOLI P; ALBINA E; JESTIN A 2003. Protection of swine against postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) protein. *Vaccine*. 21:4565-4575.

BOLIN SR; STOFFREGEN WC; NAYAR GPS; HAMEL AL 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 13:185-194.

BOREL N; BÜRGI E; KUIPEL M; STEVENSON GW; MITTAL SK; POSPISCHIL A; SYDLER T 2001. Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 143: 249-255

CALSAMIGLIA M; SIBILA M; SEGALÉS J; ROSELL C; DOMINGO M 2001. Detección de circovirus porcino tipo 2 em distintas vias de excreción: posibles vías de transmission y correlación con presencia de lesiones características de circovirosis porcina. *Sexto symposium anual de la Asociación de veterinarios especialistas en diagnósticos laboratorial*.

CASTRO AMMG; CORTEZ A; SOARES RM; RUIZ VLA; LEOMIL H; RICHTZENHAIN LJ 2003. Partial sequencing of open reading frame-1 (ORF-1) of brazilian porcine circovirus type 1 (PCV-1). *Virus Reviews & Research* 13: 80-81.

CELER V; CARASOVA P 2002. First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection of pigs in the Czech Republic by seminested PCR. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health* 49: 155-159.

CHAE C 2003. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal* 168: 41-49.

CHEUNG AK 2003a. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305:168-180.

CHEUNG AK 2003b. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313: 452-459.

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

CHOI C; CHAE C 2000. 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* 123:302-305.

CHOI C & CHAE C 2001. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Veterinary Pathology* 38: 436-441.

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

CIACCI-ZANELLA JR; & MORÉS N 2001. Diagnostico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovírus Suíno Tipo 2. *Comunicado técnico – EMBRAPA – CNPSA* 270:1-3.

CIACCI-ZANELLA JR; MORÉS N 2003. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55:522-527.

CLARK EG 1997. Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 28: 499-501.

CONTRELL TS; FRIENDSHIP RM; DEWEY CE; JOSEPHSON G; ALLAN G; WALKER I; MCNEILLY F 1999. A study investigation epidemiological risk factors for porcine circovirus type II in Ontario. *Pig J.* 44:10-17.

DULAC GC & AHMAD A 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53: 431-433.

ELLIS J; HASSARD L; CLARK E; HARDING J; ALLAN GM; WILSON P; STROKAPPE J; MARTIN K; MCNEILLY F; MEEHAN B; TODD D & HAINES D 1998. Isolation of circovirus from lesion of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39: 44-51.

ELLIS J; KRAKOWKA S; LAIRMORE M; HAINES D; BRATANICH A; CLARK E; ALLAN G; KONOBY C; HASSARD L; MEEHAN B; MARTIN K; HARDING J; KENNEDY S; MCNEILLY F 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 3-14.

FRANZA BR; RAUSCHER FJ; JOSEPHS SF & CURRAN T 1988. The Fos complex and Fos relate antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239:1150-1153.

FENAUX M; HALBUR PG; GILL M; TOTH TE; MENG X 2000. 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* 38: 2494–2503.

FERREIRA D 2001. *Proc. PMWS Meeting (ESVV)*, page 144.

GIRARD C; MORIN M; ELAZHARY Y 1992. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet. Rec.* 130: 206-207.

GRIMALDI FILHO G 1981. Manual de técnicas histológicas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.

HAMEL AL; LIN LL & NAYAR GP 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72:5262-5267.

HAMEL AL; LIN LL; SACHVIE C; GRUDESKI E; NAYAR .PS; 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64, 44\_ 52.

HARDING JC 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* , 27<sup>th</sup> Annu. Meet., page 503.

HARDING JC 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microb.* 98: 131-135.

HARDING JC; CLARK EG; STROKAPPE JH; WILLSON PI; ELLIS JA 1998. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6: 249-254.

HARMS PA 1999. Post-weaning multisystemic wasting syndrome-case studies. In: *Proceedings of the Seventh Annual Iowa Swine Disease Conference on Swine Practitioners*, pages 43-47.

HINRICHS U; OHLINGER VF; PESCH S; WANG L; TEGELER R; DELBECK FEJ; WENDT M 1999. First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. *Tierärztliche Umschau* 54:255-258.

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

KAMSTRUP S; BARFOED AM; FRIMANN TH; LADEKJÆR-MIKKELSEN A; BØTNER A 2004. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22: 1358-1361.

KENNEDY S; SEGALÉS J; ROVIRA A; SCHOLLES S; DOMINGO M; MOFFETT D; MEEHAN B; NEILL R; MCNEILLY F; ALLAN G 2003. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 151–156.

KIM J; CHUNG HK; JUNG T; CHO WS; CHOI C; CHAE C 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science* 64:57–62.

KISS I; KECSKEMETI S; TUBOLY T; BAJMOCY E; TANYI J 2000. New pig disease in Hungary: Postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Veterinaria Hungarica* 48: 469–475.

KOFTA W; WEDRYCHOWISZ H 2001. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veterinary parasitologic*. 100: 3-12.

KRAKOWAKA S; ELLIS JA; MCNEILLY F; RINGLER S; RINGS DM; ALLAN G 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet. Pathol*. 38:31-42.

KYRIAKIS SC; SAOULIDIS K; LEKKAS S; MILIOTIS C; PAPOUTSIS PA; KENNEDY S 2001. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology* 126: 38–46.

LADEKJAER-MIKKELSEN AS; NIELSEN J; STORGAARD T; BOTNER A; ALLAN GM; MCNEILLY F 2001. Transplacental infections with PCV- 2 associated with reproductive failure in a gilt. *Veterinary Record* 148: 759–760.

LAROCHELLE R; ANTAYA M; MORIN M; MAGAR R 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80: 69-75.

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

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

LEKCHAROENSUK P; MOROZOV I; PAUL SP; THANGTHUMNIYOM N; WAJJAWALKU W; MENG ZJ 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78: 8135-8145.

LUKERT P; DE BOER GF; DALE JL; KEESE P; MCNULTY MS; RANGLES JW & TISCHER I 1995. The *Circoviridae* 166-168. In F.A. MURPH, C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W. JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO, & M. D. Summers (ed), Virus taxonomy sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Springer-Verlag. Viena, Austria.

MAHE D; BLANCHARD P; TROUNG C; ARNAULD C; LE CANN P; CARIOLET R; MADEC F; ALBINA E; JESTIN A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 e type 2 porcine circoviruses and indentification of immunorevelant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81: 1815-1824.

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

MANKERTZ A; HATTERMANN K; EHLERS B & SOIKE D 2000. Cloning and sequencing columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch. Virol.* 145: 2469-2479.



MANKERTZ A; MANKERTZ J; WOLFF H & BUHK K 1998a. Identification of protein essential for replication of porcine circovirus. *J. Gen. Virol.* 79:381-384.

MANKERTZ, A; PERSSON, F; MANKERTZ, J; BLAESS, G. & TODD, D 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal General Virology*, 71:2562-2566.

MANKERTZ J; BUHK HJ; BLAESS G & MANKERTZ A 1998b. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16: 267-276.

MCNEILLY F; ALLAN GM; FOSTER JC; ADAIR BM; MCNULTY MS 1996. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49: 295-306

MEEHAN BM; CREELAN JL; MCNULTY MS & TODD D 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plants circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78:221-227.

MEEHAN BM; MCNEILLY F; MCNAIR I; WALKER I; ELLIS JA; KRAKOWKA S; ALLAN GM 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch. Virol.* 146: 835- 842.

MEEHAN BM; MCNEILLY F; TODD D; KENNEDY S; JEWHRST VA; ELLIS JA; HASSARD LE; CLARCK EG; HAINES DM & ALLAN

GM 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. *J. Gen. Virol.* 79: 2171-2179.

MONNERAT FS; 2003. Desenvolvimento de técnicas biomoleculares para diagnóstico de circovírus suíno. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 74p.

MORIN M; GIRARD C; ELAZHARY Y; FAJARDO R; DROLET R; LAGACÉ A 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *Can. Vet. J.* 31: 837-839.

MOROZOV I; SIRINARUMIR T; SORDEN SD; HALBUR PG; MORGAN MK; YOON KJ & PAUL PS 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541.

NAYAR GPS; HAMEL A; LIN L 1997. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.* 38:385-386.

NAWAGITGUL P; MOROZOV I; BOLIN SR; HARMS PA; SORDEN SD & PAUL PS 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology* 81:2281-2287.

NIELSEN J; VINCENT IE; BØTNER A; LADEKJÆR-MIKKELSEN A; ALLAN GM; SUMMERFIELD A; MCCULLOUGH KC 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced

postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 92: 97–111.

O`CONNOR B; GRAUVREAU H; WEST K; BOGDAN J; AYROUD M; CLARK EG; KONOBY C; ALLAN GM; ELLIS JA 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortion and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal* 42: 551–553.

OHLINGER VF; SCHMIDT U; PESCH S 2000. Studies on pathogenic aspects of the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress*.

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

PALLARES FJ; HALBUR PG; OPRIESSNIG T; SORDEN SD; VILLAR D; JANKE BH; YAEGER MJ; LARSON DJ; SCHWARTZ KJ; YOON KJ; HOFFMAN LJ 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14: 515-519.

PENSAERT MB; SANCHEZ RE; LADEKJÆR-MIKKELSEN AS; ALLAN GM; NAUWYNCK HJ 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology* 98:175-183

PESCH S; SCHMIDT U; OHLINGER VF 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society*, page 581.

QUINTANA J; SEGALÉS J; ROSELL C; CALSAMIGLIA M; RODRIGUÉS-ARRIOJA GM; CHIANINI F; FOLCH JM; MALDONADO J; CANAL M; PLANA-DURÁN J; DOMINGO M 2001. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 149: 357-361.

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

SAMBROOK J; FRISTSCH, EF; MANIATS T 1989. Molecular Cloning – A laboratory manual. 2<sup>nd</sup>, New York: *Gold spring harbor laboratory press*. Plainview.

SANGER F; NICKLEN S; AND COULSON AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74: 5463–5467.

SAOULIDIS K; KYRIAKIS SC; KENNEDY S; LEKKAS S; MILIOTIS CC; ALLAN GM; BALKAMOS GC; PAPOUTSIS PA 2002. First report

of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health* 49: 202–205.

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

SEGALÉS J; SITJAR M; DOMINGO M; DEE S; DEL POZO M; NOVAL R; SACRISTÁN C; DE LAS HERAS A; FERRO A; LATIMER KS 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record* 141: 600–601.

SEGALÉS J; DOMINGO M; 2002a. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly* 24: 109–124.

SEGALÉS J; CALSAMIGLIA M; ROSELL C; SOLER M; MALDONADO J; MARTÍN M, DOMINGO M 2002b. Porcine reproductive and respiratory síndrome (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet. Microbiol.* 85: 23-30.

SEGALÉS J; DOMINGO M; ROSELL C 2004. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98 :137–149

SIBILA M; CALSAMIGLIA M; SEGALÉS J; DOMINGO M 2001. Detection of porcine circovirus type 2 genoma in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polimerase chain reaction.

Porcine Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Proceedings of the meeting on ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates, Saint Malo*, 115.

SIPOS W; DUVIGNEAU JC; WILLHEIM M; SCHILCHER F; HARTL RT; HOFBAUER G; EXEL B; PIETSCHMANN P; SCHMOLL F 2004. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99:63-71

SMITH WJ; THOMSON JR; DONE S 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record* 132: 47.

SPILLANE P; KENNEDY S; MEEHAN B; ALLAN GM 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Veterinary Record* 143: 511-512.

STEINFELDT T; FINSTERBUSCH T & MANKERTZ A 2001. Rep and Rep'protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291:152-160.

TISCHER I; BODE L; PETERS D; POCIULI S & GERMANN B 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140:737-743.

TISCHER I; GELDERBLOM H; VETTERMENN W & KOCH MA 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.

TISCHER I; MIELDS W; WOLFF D; VAGT M & GREIM W 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 96:39-57.

THIBAUT S; DROLET R; GERMAIN MC; D-ALLAIRE S; LAROCHELLE R; MAGAR R 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology* 35: 108–116.

TODD D; NIAGRO FD; RITCHIE BW; CURRAM W; ALLAN GM; LUKERT PD; LATIMER KS; STEFFENS WL & MCNULTY MS 1991. Comparison of three animal viruses with circular-stranded DNA genomes. *Arch.Virol.* 117: 129-135.

TRUJANO M; IGLESIAS G; SEGALÉS J; PALACIOS JM 2001. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Veterinary Record* 148: 792.

ULMER JB; SADOFF JC; LIU MA 1996. DNA vaccines. *Current. Opinion. Immunol.*, 8: 531-536.

VYT P; LABAR G; BOS M; NAUWYNCK H; ROELS S; MIRY C; PENSAERT M; DUCATELLE R 2000. The post-weaning multisystemic wasting syndrome in Belgium. *Flemish Veterinary Journal* 69: 435-440.

WELLENBERG GJ; PESCH S; BERNDSEN FW; STEVERINK PJ; HUNNEMAN W; VAN DER VORST TJ; PEPPERKAMP NH; OHLINGER VF; SCHIPPERS R; VAN OIRSCHOT JT; JONG MF 2000. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs

showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 22: 167-172.

WEST KH; BYSTROM JM; WOJNAROWICZ C; SHANTS N; JACOBSEN M; ALLAN GM; HAINES DM; CLARCK EG; KRAKOWKA SJ; MCNEILLY F; KONOBY CA; MARTIN K; ELLIS JA 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Diagnostic Investigations* 11:530-532.

ZHOU JY; SHANG SB; GONG H; CHEN QX; WU JX; SHEN HG; CHEN TF; GUO JQ 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal *J. Biotechnology*. 118: 201-211.