

FILIPPE SILVA MONNERAT

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS BIOMOLECULARES
PARA DIAGNÓSTICO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO

Tese 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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

FILIPPE SILVA MONNERAT

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS BIOMOLECULARES
PARA DIAGNÓSTICO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO

Tese 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: 4 de abril de 2003

Prof. Mauro Pires Moraes
(Conselheiro)

Prof. José Lúcio dos Santos
(Conselheiro)

Prof. George Henrique Kling de Moraes

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida
(Orientadora)

Aos meus queridos pais, Luiz e Dôra.

À minha amada esposa Janaína.

Aos meus irmãos, Fernando, Cecília e Joana.

Ao meu avô Braz (*in memoriam*).

Aos meus afilhados, André e Ana Beatriz.

AGRADECIMENTO

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 demais professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Veterinária, com os quais muito pude aprender durante o nosso convívio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À professora orientadora Márcia Rogéria de Almeida, pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e pelo apoio que tanto me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor conselheiro Mauro Pires Moraes, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo acompanhamento durante a execução do experimento.

Ao professor conselheiro José Lúcio dos Santos, pelos ensinamentos pelo apoio, pela amizade e, principalmente, incentivo.

Aos colegas do projeto circovírus suíno, pelo convívio diário, pelo incentivo e pela amizade.

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

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. OBJETIVOS.....	17
4. CAPÍTULO I – PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)	18
4.1. INTRODUÇÃO.....	19
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.2.1. Cultivo celular.....	23
4.2.2. Purificação de DNA.....	24
4.2.3. Oligonucleotídeos.....	25
4.2.4. Amplificação por PCR.....	25
4.2.5. Produção de conjugado anti-IgG suína.....	26
4.2.6. Imunofluorescência indireta (IFI).....	28
4.2.7. Análise de susceptibilidade de células.....	28
4.3. RESULTADOS.....	30
4.3.1. Padronização de PCR para detecção de PCV2.....	30
4.3.2. Susceptibilidade de diferentes linhagens	

celulares ao cultivo de PCV1.....	32
4.3.3. Padronização de ensaio de Imunofluorescência Indireta.....	34
4.4. DISCUSSÃO.....	36
5. CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE CAMPO E ISOLAMENTO EM CÉLULAS SK6.....	42
5.1. INTRODUÇÃO.....	43
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.2.1. Amostra.....	47
5.2.2. Purificação de DNA.....	47
5.2.3. Oligonucleotídeos.....	48
5.2.4. Amplificação por PCR.....	48
5.2.5. Isolamento viral.....	49
5.2.6. Imunofluorescência indireta (IFI).....	50
5.3. RESULTADOS.....	51
5.3.1. Padronização de PCR para detecção de PCV2.....	51
5.3.2. Susceptibilidade de diferentes linhagens celulares ao cultivo de PCV1.....	55
5.3.3. Padronização de ensaio de Imunofluorescência Indireta.....	56
5.4. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	71
ANEXO 1.....	72
ANEXO 2.....	73

ANEXO 3.....

74

RESUMO

MONNERAT, Filipe Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Desenvolvimento de técnicas biomoleculares para diagnóstico de circovírus suíno.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida. Conselheiros: Mauro Pires Moraes e José Lúcio dos Santos.

O circovírus suíno (PCV) é um agente amplamente distribuído na Europa, América do Norte e sul da Ásia. O PCV é um pequeno vírus de cadeia simples de DNA (17 nm) que foi reconhecido, a partir da década de 90, como um patógeno de suíno. Dois tipos de PCV tem sido caracterizados e designados PCV tipo 1 (PCV1) e PCV tipo 2 (PCV2). O PCV1 foi primeiramente isolado em 1974 como um contaminante persistente da linhagem de células PK-15 de rim de suíno (ATCC CCL 31) e a cepa de PCV isolada de células PK-15 tem sido bem caracterizada. O PCV1 é considerado como um vírus não patogênico, enquanto que a infecção de um suíno pelo PCV2 é normalmente associada ao desenvolvimento de Síndrome Multissistêmica Pós-Desmame (PMWS), em animais de 5 a 12 semanas de idade, e ao tremor congênito (CT), que acomete animais no período neonatal. A PMWS é uma nova doença emergente de suínos, caracterizada clinicamente por dispnéia progressiva, aumento dos nódulos linfáticos e patologicamente caracterizada por uma ampla extensão de lesões inflamatórias. Recentemente, pesquisadores da EMBRAPA iniciaram um estudo da PMWS em leitões, mas no Brasil a

presença do PCV ainda não é reconhecida oficialmente. O objetivo desse trabalho foi (1) padronizar técnicas de diagnóstico para o genoma e antígeno do PCV, assim como anticorpos contra o agente; (2) avaliar a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares ao PCV; (3) diagnosticar a infecção do PCV em suínos da Zona da Mata de Minas Gerais; (4) isolar o PCV de amostras positivas. O PCV, proveniente de tecidos de animais normais e com diagnóstico de CT, foi isolado em células SK6 e analisadas por PCR. O padrão de bandas foi o mesmo encontrado em células PK15 contaminadas com PCV2, gentilmente cedidas pela EMBRAPA. Os oligos usados diferenciavam o PCV1 do PCV2. Todos os leitões de maternidade testados por PCR foram positivos para o PCV2. Porém, em 59 animais de abate testados por PCR não foi observada a presença do PCV. No teste de susceptibilidade as células PK15, SK6, VERO e MDCK foram susceptíveis ao PCV, mas somente as PK-15 estavam persistentemente infectadas. No ensaio de imunofluorescência indireta, foi utilizado um conjugado anti-IgG suína previamente padronizado e anticorpos contra PCV foram identificados em soros de 24 em 44 animais de abate testados e nenhum anticorpo foi encontrado nos animais com diagnóstico de CT positivos para PCV2 por PCR. Com esses resultados podemos concluir que os 24 suínos de abate soropositivos entraram em contato com o agente e desenvolveram a infecção em alguma fase durante o estágio de produção. A ausência de soropositivos entre os leitões recém nascidos, aliada a presença de infecção, pode ser explicada pela incapacidade de produção de anticorpos por esses animais neste estágio de desenvolvimento. Estudos adicionais da epidemiologia e da imunologia de infecções pelo PCV são necessários para o melhor entendimento e efetivo controle das doenças associadas a esse vírus.

ABSTRACT

MONNERAT, Filipe Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003. **Development of biomolecular techniques for diagnosis of the porcine circovirus.** Graduate Advisor: Márcia Rogéria de Almeida. Committee members: Mauro Pires Moraes e José Lúcio dos Santos.

Porcine circovirus (PCV) is thoroughly an agent distributed in Europe, North America and south of Asia. PCV is a small virus of simple chain of DNA (17 nm) that was recognized, starting from the decade of 90, as a swine pathogen. Two types of PCV have been characterized and designated PCV type 1 (PCV1) and PCV type 2 (PCV2). PCV1 was isolated firstly in 1974 as a persistent contaminant of the lineage of cells PK-15 of swine kidney (ATCC CCL 31) and the stump of isolated PCV of cells PK-15 has been well characterized. PCV1 is considered as a non-pathogenic virus, while the infection of a swine for PCV2 is usually associated to Post weaning Multisistemic Wasting Syndrome (PMWS), in animals from 5 to 12 weeks of age, and to the congenital tremor (CT), that attack animals in the neonatal period. PMWS is a new emergent disease of swine, clinically characterized by progressive dispnea, increase of the lymphatic nodules and pathologically characterized by a wide extension of inflammatory lesions. Recently, researchers of EMBRAPA began a study of PMWS in pigs, but in Brazil the presence of PCV is not still recognized officially. The objective of that work was (1) to standardize diagnosis

techniques for the genome and antigen of PCV, as well as antibodies against the agent; (2) to evaluate the susceptibility of different cellular lineages to PCV; (3) to diagnose the infection of PCV in swine of the Zona da Mata of Minas Gerais; (4) to isolate PCV of positive samples. PCV, originating from tissues of normal animals and with diagnosis of CT, it was isolated in SK6 cells and analyzed by PCR. The pattern of bands was the same found in contaminated cells PK15 with PCV2, kindly by EMBRAPA. The used oligos differentiated PCV1 of PCV2. All the pigs of maternity tested by PCR were positive for PCV2. However, in 59 slaughtering animals tested by PCR, PCV was not found. In susceptibility test, PK15, SK6, VERO and MDCK cells were susceptible for both PCV but only PK15 cells were persistently infected. Anti-PCV antibodies were found to be positive in 54,5% of slaughtering animals serum and any anti-PCV antibody was found in animals with clinical CT. Rapid and accurate diagnosis and removal of disease animals from farms, combined with good husbandry practices, would appear to be the only current method of controlling losses attributable to PCV2 infections. However, additional studies into the epidemiology and immunology of PCV infections are now required if better understanding and eventual control of the disease syndromes associated with these viruses are to be achieved.

1. INTRODUÇÃO

Os agentes infecciosos de suínos estão recebendo uma grande atenção devido ao crescimento do potencial econômico da carne suína no contexto comercial mundial. A necessidade de se produzir mais através da diminuição do período de lactação, aumento do número de desmamados por porca e ganho de peso, melhoria da sanidade, entre outros fatores, vem fazendo com que alguns criadores busquem melhores características com a aquisição de matrizes com material genético importado. A partir da década de 90, muitos países tiveram grandes perdas produtivas devido a agentes patogênicos, principalmente vírus. Alguns desses países são fontes de material genético para o Brasil. Portanto, faz-se necessária melhor caracterização de vírus de suínos e desenvolver testes de diagnósticos para a sua detecção.

O circovírus suíno (PCV) está amplamente distribuído em suínos por todo o mundo (ALLAN et al., 1994c; CLARK, 1997; DAFT et al., 1996; EDWARDS & SANDS, 1994; HORNER, 1991; LeCANN et al., 1997; SÉGALES et al., 1997; TISCHER et al., 1982;). Trata-se de um pequeno vírus de cadeia simples de DNA que tem sido reconhecido, a partir da década de 90, como um patógeno de suíno. Dois tipos de PCV têm sido caracterizados e designados PCV tipo 1 (PCV1) e PCV tipo 2 (PCV2) (ALLAN & ELLIS, 2000). O PCV1 é considerado como vírus não patogênico, enquanto que a infecção pelo PCV2 é normalmente associada ao desenvolvimento de Síndrome Multissistêmica Pós-Desmame (PMWS) em animais de 5 a 12 semanas de idade e ao Tremor Congênito (CT), que acomete animais no período neonatal.

A ocorrência comum da infecção pelo PCV em suínos, a demonstração de anticorpos específicos contra PCV em humanos e a diversidade genética entre as cepas de PCV sugerem a necessidade de uma avaliação dos riscos do PCV como um potencial agente zoonótico (TISCHER et al., 1995). Técnicas como PCR, RFLP, hibridização in situ e imunofluorescência indireta são úteis nos laboratórios de diagnóstico veterinário para testes de rotina e vigilância da infecção com PCV2 (HAMEL et al., 2000).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) detectou a presença do antígeno de PCV2 por testes de imunoperoxidase e, também, observou a presença de lesões características da PMWS em tecidos (CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2001).

Em granjas livres da peste suína clássica, doença de Aujeszky e granjas que não fazem uso de produtos químicos para controle de ectoparasitas, tem sido observado uma epidemia de CT em leitões nascidos em um período de quatro meses ou mais após a introdução de machos e/ou fêmeas de reposição. Todas as tentativas de tratamentos em suínos adultos e leitões não surtiram efeitos, levando a uma alta mortalidade dos leitões e, conseqüentemente, graves prejuízos econômicos para o produtor.

A importação de material genético pode ser o principal fator de risco responsável pela introdução da PMWS no país. O desenvolvimento das técnicas de diagnóstico poderá monitorar a entrada do material genético no Brasil, impedindo assim a entrada do PCV2. Além disso, o domínio dessas técnicas por pesquisadores brasileiros permitirá o repasse, treinamento de técnicos de laboratório ligados à área de diagnóstico veterinário e uma conseqüente melhoria na qualificação do profissional.

Os objetivos desse trabalho foram, padronizar técnicas de diagnóstico para o genoma e antígeno do PCV, assim como anticorpos contra o agente; avaliar a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares

ao PCV; diagnosticar a infecção do PCV em suínos da Zona da Mata de Minas Gerais; isolar o PCV de amostras positivas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O PCV foi primeiramente isolado em 1974 (TischeR et al., 1974) em células de rim de porco da linhagem celular PK-15 (ATCC-CCL31), a qual é infectada cronicamente por este vírus. Trata-se de um vírus não envelopado de 17 nm de diâmetro contendo uma única fita de DNA circular de aproximadamente 1,7 kb e 580 kDa. Baseado na sua morfologia e em seu DNA genômico circular de fita simples, o PCV isolado de células PK-15 foi classificado na família Circoviridae (falar da fam) (LUKERT et al., 1995). O PCV1 isolado de células PK-15 é considerado como um vírus não patogênico, enquanto que a infecção de um suíno pelo PCV2 é normalmente associada ao desenvolvimento de Síndrome Multissistêmica Pós-Desmame (PMWS), em animais de 5 a 12 semanas de idade e ao CT, que acomete animais no período neonatal.

A PMWS foi inicialmente descrita no Canadá em 1991 (CLARK, 1997; HARDING, 1997) e caracteriza-se por perda progressiva de peso, sinais respiratórios e icterícia. A PMWS afeta primariamente suínos entre 6 e 8 semanas de idade e raramente afeta suínos que estão amamentando. Essa síndrome está sendo diagnosticada nos rebanhos negativos e positivos para a síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), mas o diagnóstico de PMWS é complicado no rebanho positivo para PRRS devido às infecções secundárias. As taxas de morbidade e mortalidade em suínos pós-desmame foram descritas como bastante altas, chegando a 50% em populações de suínos (HARDING, 1997).

Antígeno e ácido nucléico de PCV foram demonstrados em lesões de vários órgãos de suínos provenientes do Canadá e em tecidos de animais apresentando sinais clínicos similares na Califórnia (DAFT et al., 1996), França (LeCANN et al., 1997) e Espanha (SÉGALES et al., 1997). Estes

achados levaram à especulação de que um novo ou modificado PCV patogênico denominado PCV2 poderia ter surgido de populações suínas (ALLAN et al., 1998).

ELLIS et al. (1998) demonstraram em animais infectados com a PMWS a presença do circovírus por microscopia eletrônica, isolamento do vírus em cultura celular, hibridização *in situ* e coloração imunohistoquímica com soro de coelho e antisoro de suíno.

Carcaças de suínos com PMWS apresentaram variados graus de degeneração muscular (CLARK, 1997; DAFT et al., 1996). A pele mostrou ictérica em aproximadamente 20% dos casos. Todos os nódulos linfáticos apareceram aumentados de três a quatro vezes e apresentaram a superfície de corte homogênea e pálida.

Exames microscópicos de tecidos corados por hematoxilina-eosina revelaram em animais com a PMWS podem ser observados corpúsculos de inclusão com uma coloração intensamente basofílica em grande parte dos nódulos linfáticos, tonsilas e placas de Peyer's do íleo (HARDING, 1997).

Segundo ALLAN *et al.* (1994c), o circovírus suíno é resistente à inativação quando exposto a pH 3,0, clorofórmio, temperaturas de 56° e 70°C, possui um gradiente de densidade em CsCl de 1,33-1,34 mg/mL e um coeficiente de sedimentação de 57S quando comparados ao coeficiente de sedimentação conhecido de enterovírus bovino.

NAYAR *et al.* (1997) utilizaram o teste de PCR para detectar um PCV característico associado com a PMWS (PCV2). Nos suínos afetados pela PMWS, foram encontrados o PCV2, mas não o PCV não-patogênico (PCV1). Os produtos de amplificação do PCV2 e do PCV1 foram facilmente distinguíveis um do outro pelo polimorfismo do tamanho dos fragmentos produzidos por enzimas de restrição (RFLP). Os produtos de amplificação obtidos de todas as amostras clínicas de tecidos positivas para PCR mostraram perfis de RFLP únicos para PCV2 e totalmente distintos do

PCV1. Eles identificaram pelo menos três sítios de enzimas de restrição (RE) no PCV em suínos com a PMWS. Eles concluíram então que os sítios de RE encontrados no genoma do PCV de suínos com PMWS foram diferentes dos sítios de RE encontrados no genoma do PCV não-patogênico.

HAMEL *et al.* (2000) detectaram o PCV2 e o PCV1 utilizando o teste de PCR. Ambos os tipos, PCV1 e PCV2, produziram produtos de amplificação de 438 pb, os quais foram facilmente identificados e diferenciados um do outro pela análise de RFLP. O circovírus suíno foi detectado em 55% dos suínos testados aleatoriamente com vários sinais clínicos da doença e lesões, sendo que a maioria deles foram difíceis de diferenciar daqueles associados com a PRRS. Os produtos de PCR de todas as amostras clinicamente positivas, detectadas pelo RFLP, demonstraram ser apenas PCV2. Os perfis de RFLP encontrados com o PCV-2 tem sido caracterizados como PCV-2 A (mais comum), PCV-2 B, PCV-2 C, PCV-2 D, PCV-2 E.

As lesões decorrentes da PMWS têm sido reproduzidas experimentalmente após inoculação de leitões com PCV-2 isolados de cultura de células, embora a total expressão dessa síndrome pode requerer a presença de outros agentes, tais como o parvovírus suíno ou o vírus causador da PRRS. Recentes investigações têm ligado o PCV-2 a outras desordens em suínos, variando de abortos e fracasso na reprodução até a atípica PRRS. Dados disponíveis na literatura indicam uma alta soroprevalência de anticorpos contra PCV-2 em todo o mundo. O diagnóstico da doença associada ao PCV-2 é baseado na demonstração direta de antígenos PCV-2 ou de ácidos nucleicos nos tecidos afetados. Embora a transmissão vertical tem sido documentada, a epidemiologia das infecções de PCV-2 é pobremente entendida, assim como o papel da

resposta imune no controle ou no aumento da doença (ALLAN & ELLIS, 2000).

Em um estudo de patogênese do PCV, TISCHER *et al.* (1986) infectaram experimentalmente seis suínos com nove meses de idade negativos para anticorpos contra PCV. Foram coletados “swabs” do nariz e das fezes desses animais, diariamente, depois de 14 dias após a infecção e processados para o isolamento viral. O PCV foi apenas isolado de três animais aos 13 e 14 dias após a infecção. Nenhum desses suínos infectados experimentalmente mostraram sinais da doença. No exame pós-morte, nenhum sinal da infecção foi encontrado e exames histopatológicos de fígado, coração, rim, pulmão, baço e cérebro não indicaram a infecção específica do vírus. Além disso, o PCV não foi detectado em preparações de cultura de células de rins e pulmões de dois suínos sacrificados após seis semanas de infecção. Esses autores também infectaram quatro leitões de um dia com PCV e, novamente, fracassaram ao demonstrar a doença clínica ou alterações graves pós-morte. Eles concluíram, a partir desses resultados, que esse vírus parece causar apenas uma infecção inofensiva em suínos, a qual é controlada pelo mecanismo de defesa imunológica do animal.

GUSTAFSON & KANITZ (1974) descreveram previamente a transmissão de um vírus causador de CT. A micrografia eletrônica do vírus que eles isolaram foi similar ao PCV e, como o PCV, o vírus isolado não foi capaz de causar um efeito citopático em cultura de células. Eles relataram que o vírus foi capaz de induzir o tremor de leitões quando as porcas foram expostas em diferentes estágios da gestação.

Os sinais clínicos do CT são altamente variados e os tremores variam de leves a severos. O número de suínos afetados dentro de uma ninhada também pode variar consideravelmente. Os tremores severos podem causar morte durante a primeira semana de vida devido à impossibilidade de

amamentar-se, podendo morrer por fome. Suínos que resistem por uma semana, normalmente sobrevivem e a maioria destes recupera-se em três semanas. Os tremores podem ser bilaterais e sublaterais, afetando o músculo esquelético quando os porcos estão adormecidos. Os tremores podem ser iniciados ou acentuados por estímulos externos, tais como barulhos inesperados e friagem. Produtores relataram que alguns suínos nunca recuperam totalmente e continuam a tremer durante a fase de crescimento e de terminação. A ninhada afetada normalmente é proveniente de uma linhagem ou matriz nova, recentemente introduzida em uma granja, o que poderia indicar a exposição dessa linhagem soronegativa ao vírus em uma fase crítica da gestação (HINES & LUKERT, 1994).

A seqüência de nucleotídeos de PCV foi demonstrada primeiramente por BUHK *et al.* (1985). Dentro das seqüências dos circovírus disponíveis no banco de dados, uma característica comum é encontrada. Com exceção do vírus da anemia aviária todos contêm uma estrutura em forma de grampo, com um motivo de nove bases conservadas (TAXTAYTMS) dentro da sua origem de replicação. No CAV, as nove bases são encontradas, mas fora da estrutura em forma de grampo. A estrutura em forma de grampo e a seqüência de nove bases conservadas podem ser o ponto inicial da síntese da fita viral positiva durante a replicação de círculo rolante (STANLEY *et al.*, 1995; HEYRAUD *et al.*, 1993). Uma estrutura em forma de grampo com a seqüência similar TAGTATTAC também foi encontrada na origem de replicação do PCV (MANKERTZ *et al.*, 1997; Figura 1).

O genoma inteiro do PCV foi clonado e por análise da seqüência completa de nucleotídeos, foram detectadas seis potenciais seqüências de leitura aberta (ORFs) sobrepostas, com ausência de regiões intergênicas, maiores que 285 pb (BUHK *et al.*, 1988; MANKERTZ *et al.*, 1997). A maior ORF (ORF1, Figura 1) parece estar relacionada com a codificação da

proteína de replicação (proteína Rep) do PCV. O produto putativo da ORF1 apresenta 312 aminoácidos, onde 4 motivos tem sido identificados por homologia com seqüências conhecidas, sendo uma caixa GKS, a qual pode estar envolvida na ligação com nucleotídeos e 3 regiões que são características de proteínas envolvidas na replicação por círculo rolante (KOONIN & ILYINA, 1993). Quando a proteína Rep de PCV foi comparada com as proteínas associadas à replicação de circovírus e geminivírus de plantas, encontrou-se que a proteína codificada pela ORF1 tem uma forte similaridade com as proteínas Rep destes vírus (MANKERTZ *et al.*, 1997; MEEHAN *et al.*, 1997).

NAWAGITGUL *et al.* (2000b) identificaram uma proteína de 30 kDa em partículas purificadas de PCV2. A ORF2 foi clonada no vetor de expressão baculovirus e o produto gênico foi expresso em células de inseto, apresentando peso molecular igual a 30 kDa, como esperado. A proteína recombinante codificada a partir da ORF2 assemelhou-se à partículas do capsídeo quando observada por microscopia eletrônica. Anticorpos contra essa proteína foram detectados em amostras de soros obtidos de suínos com menos de 3 semanas de infecção experimental com PCV2. A proteína codificada a partir da ORF2 contém uma seqüência conservada de aminoácidos básicos na porção N-terminal semelhante à maior proteína estrutural do vírus da anemia aviária (CAV).

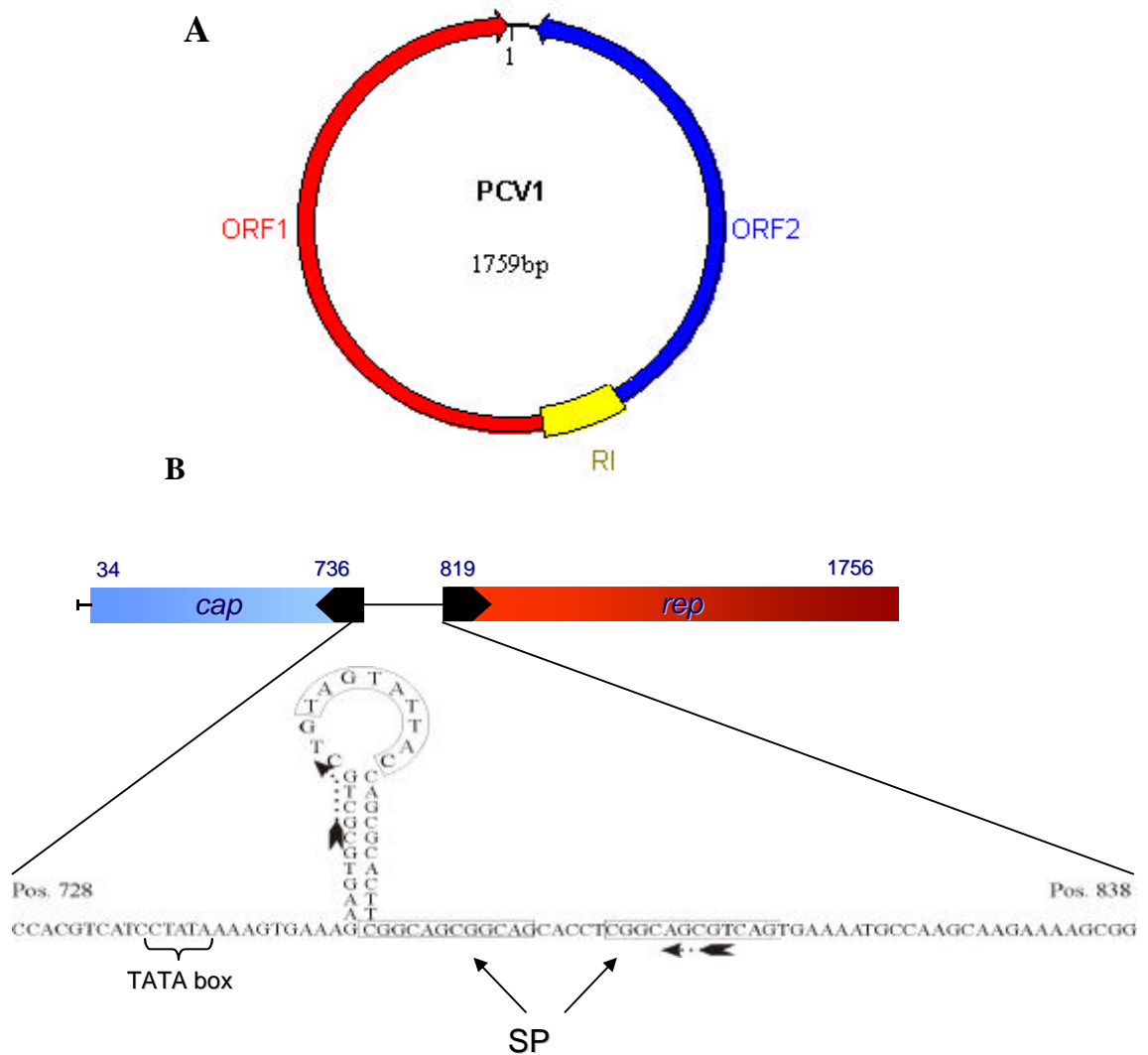


FIGURA 1- (A) **Mapa genético do PCV1.** São mostradas as duas maiores ORFs do PCV1, a ORF2 (em azul) que codifica para a maior proteína do capsídeo e a ORF1 (em vermelho) que codifica para proteínas de replicação (Rep). Em amarelo é mostrada uma região intergênica que dá origem a uma estrutura em forma de grampo, a origem da replicação do PCV1. (B) **Representação esquemática do genoma do PCV1.** São mostradas as duas maiores ORFs do PCV1, a ORF2 (em azul) e a ORF1 (em vermelho). A região intergênica (RI em A) que dá origem a uma estrutura em forma de grampo está ampliada. Nota-se um nonômero de nucleotídeos delineado no ápice da estrutura onde ocorrerá a quebra pela proteína Rep. Pode ser observado, também, o TATA box, onde se ligará o promotor e a presença de algumas seqüências palindrômicas (SP) (MANKERTZ *et al.*, 1997).

Recentemente, CHEUNG (2003) caracterizou os RNAs de PCV2 sintetizados durante uma infecção produzida em uma linhagem de células PK15 livres de PCV1. Um total de nove RNAs foram detectados (um que codificava para uma proteína do capsídeo viral (CR), um “cluster” de cinco RNAs associados à proteína Rep e três RNAs associados a proteínas não estruturais - NS). Três desses NS-RNAs (NS515, NS672 e NS0) são transcritos a partir de três diferentes promotores dentro da ORF1 “downstream” do promotor de Rep.

LAROCHELLE *et al.* (2002) descreveram 34 seqüências de PCV2 no Oeste do Canadá originários de condições clínicas diversas entre os anos 1990 a 2001 e realizaram uma análise filogenética destas seqüências e de outras 36 seqüências de PCV2 presentes no Genbank. Análises de seqüência do genoma completo indicaram que as cepas de PCV2 canadenses analisadas no estudo foram fortemente relacionadas entre si e, também, com outras seqüências de PCV2 originadas do Leste do Canadá, EUA, Europa e Ásia. Análises de seqüências baseada nos genes ORF1 e ORF2 de 34 seqüências revelaram que a variação de nucleotídeos foi maior entre as ORF2 que entre as ORF1. O alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína do capsídeo do PCV2 identificou três regiões principais de heterogeneidade de aminoácidos, duas das quais correspondem a áreas de imunoreatividade dominantes. Análise filogenética de todas as 70 seqüências citadas acima revelou um agrupamento grande, composto de seqüências da Europa, Taiwan, China e Canadá. Este agrupamento poderia ser dividido em vários sub-grupamentos, dois dos quais, canadenses, foram fortemente relacionados com seqüências da Alemanha. As seqüências restantes do Canadá e dos EUA foram alojadas em agrupamentos pequenos ao longo da árvore filogenética e uma associação com a origem geográfica não pôde ser estabelecido. As caracterizações genômicas realizadas neste estudo

indicaram que as seqüências de PCV2 associadas com a PMWS foram difundidas freqüentemente ao longo da árvore filogenética em agrupamentos que incluem seqüências de PCV2 identificados de outros casos como a síndrome respiratória reprodutiva suína (PRRS), tremores generalizados, síndrome nefropática e dermatite suína (PDNS), artrite, sinais nervosos, erisipelas e até mesmo de porcos saudáveis (LAROCHELLE *et al.*, 2002).

O PCV se replica no núcleo de células infectadas produzindo uma forma replicativa de DNA fita dupla (RF dsDNA). Além da RF dsDNA e do DNA fita simples (ssDNA) 13 S do vírus, um pequeno DNA 5 S, representando uma região definida do genoma viral, pode ser isolado de extratos de células infectadas e de vírus altamente purificados. A fração de DNA 5S é introduzida concomitantemente com o ssDNA 13 S na infecção de células por PCV, entretanto, esta fração também é detectada em células transfectadas com o DNA 13 S purificado. O segmento 5 S pode ser detectado em 2 formas, na forma de fita simples e na forma de fita dupla estável a nuclease S1. A replicação viral depende da presença do genoma completo do PCV, sugerindo que a porção 5S apresenta a origem de replicação (TISCHER *et al.*, 1995).

Durante a fase G1 há produção do fator de ativação transcricional AP-1, que se liga especificamente à seqüência consenso TGA (C/G) TCA (FRANZA *et al.*, 1988). O sítio de ligação para AP-1 e similares já foi encontrado em outros vírus, como SV 40 (LEE *et al.*, 1989), poliovírus (MARTIN *et al.*, 1988), visnavírus (HESS *et al.*, 1989) e HTLV-1 (JEANG *et al.*, 1991). A seqüência TGAGTCT, que é similar ao sítio de ligação para AP-1, foi identificada no genoma do PCV. TISCHER *et al.* (1995) sugeriram a possibilidade do envolvimento de uma proteína viral na replicação, a qual seria regulada por fatores celulares. Esses autores

correlacionaram o aparecimento de um antígeno primário (EA) do PCV com a presença de formas replicativas e a fração 5S do genoma viral.

A replicação genômica de PCV1 depende da expressão da cadeia total da proteína Rep de uma isoforma originada de “splicing” (Rep’) e da presença de um fragmento de 111pb que inclui a origem de replicação (STEINFELDT *et al.*, 2001).

Em um estudo recente, CHEUNG (2003) sugeriu que *Rep* é capaz de codificar uma proteína associada à replicação (RepP), parecendo ser o transcrito primário que dava origem a Rep’, Rep3a, Rep3b e Rep3c por “splicing” alternado. O alinhamento da seqüência de aminoácidos mostrou que as proteínas RepP e Rep’ de PCV2 são equivalentes àquelas descritas para PCV1, as quais foram mostradas como sendo essenciais para a replicação do DNA viral (MANKERTZ & HILLENBRAND, 2001).

Estudos sorológicos para anticorpos contra PCV em soros de suínos da Alemanha (TISCHER *et al.*, 1982; TISCHER *et al.*, 1986), Canadá (DULAC & AHMAD, 1989), Nova Zelândia (HORNER, 1991), Grã-Bretanha (EDWARDS & SANDS, 1994), Irlanda do Norte (ALLAN *et al.*, 1994c), França (MADEC *et al.*, 2000) e Ásia (CHOI *et al.*, 2000) indicaram uma infecção amplamente disseminada em suínos adultos nesses países, o que leva a crer que a infecção pelo PCV em suínos é distribuída mundialmente.

Estudos sobre a epidemiologia de infecções pelo PCV no rebanho suíno tem sido descritos. TISCHER *et al.* (1986) demonstraram que 60% dos soros de suínos abatidos na Alemanha apresentaram títulos de anticorpos contra PCV tão altos quanto aqueles encontrados de 2 a 6 semanas após a infecção experimental de suínos com esses vírus. A partir desses resultados, eles concluíram que a infecção de suínos com PCV ocorre em unidades de terminação, onde os animais estão em contato muito próximo. Em um estudo mais detalhado do perfil de anticorpos contra PCV

em duas ninhadas de leitões em um rebanho de crescimento infectado com PCV na Irlanda do Norte mostrou que os anticorpos do soro contra PCV derivados da mãe desapareceram de oito a nove semanas após o nascimento. Os anticorpos do soro reapareceram de 13 a 15 semanas após o nascimento, indicando a exposição a esses vírus entre 11 e 13 semanas após o nascimento. Essa escala de tempo correspondeu precisamente com o movimento dos suínos da unidade de crescimento para a unidade de terminação dentro dessa granja. Resultados de testes de neutralização do soro e IFI em soros de animais de campo e anticorpos monoclonais indicaram, nesse estudo, a existência de apenas um sorotipo de PCV (ALLAN *et al.*, 1994a, ALLAN *et al.*, 1994c).

Segundo ALLAN *et al.* (1994b), o PCV pode replicar em culturas de monócitos/macrófagos de suínos derivadas do sangue periférico de outras fontes e a replicação viral foi também demonstrada em culturas de monócitos/macrófagos de bovinos. Estudos da função imune *in vitro* em macrófagos alveolares de suínos infectados com PCV (McNEILLY *et al.*, 1996) não indicaram nenhum efeito sobre a expressão de receptores Fc e de receptores de complemento ou sua habilidade para fagocitar e matar células de *Candida krusei* envoltas pelas proteínas do sistema complemento. Entretanto, um aumento na regulação do antígeno MHC classe 1 foi observada quatro dias após a inoculação de macrófagos alveolares com PCV e uma redução no número de células expressando antígeno MHC classe 2 aos oito dias após a inoculação. Além disso, reduções significativas ($P < 0,05$) na proliferação de linfócitos mediada por macrófago e induzida por mitógeno foram observadas após a inoculação com PCV. Esses resultados indicaram que infecções com PCV podem interferir com a função imune normal.

ALLAN *et al.* (1995) descreveram que o antígeno PCV foi detectado nas células de uma variedade de tecidos do sistema linfóide, do pulmão e

do intestino. O vírus predominou nos tecidos do baço, timo e pulmão e foi associado com macrófagos/monócitos, histiócitos, macrófagos tímicos e/ou células apresentadoras de antígenos. A associação do PCV com esses tipos celulares indicou um possível papel patogênico para o PCV como um agente envolvido na disfunção imune em comum com outros membros da família *Circoviridae*. Nenhum antígeno PCV foi detectado em amostras de tecidos do sistema nervoso central e nenhuma anormalidade clínica foi observada em qualquer um dos suínos infectados experimentalmente.

Em um estudo realizado na Bélgica, SANCHEZ JR. *et al.* (2001) examinaram a habilidade do PCV2 de replicar em fetos de diversas fases gestacionais e de causar anormalidades patológicas quando dois fetos foram inoculados aos 57, 75 e 92 dias de gestação. Os outros fetos da mesma porca gestante não foram inoculados a fim de se avaliar a propagação intra-uterina. Vinte e dois dias após inoculação os fetos foram coletados e examinados a procura da ocorrência de lesões grosseiras e de infecção em órgãos como coração, pulmões, baço, fígado, rins, linfonodos, cérebro, soro sanguíneo e fluidos corporais. A replicação viral foi identificada em todos os fetos inoculados. Porém a propagação intra-uterina do PCV2 não ocorreu.

Anticorpos contra PCV foram encontrados em um levantamento sorológico feito em porcas de 11 fazendas da Geórgia, uma fazenda da Carolina do Norte e uma em Iowa. Em um estudo de campo utilizando 10 porcas soronegativas e 10 soropositivas contra PCV, foi demonstrado que 12 delas apresentaram soroconversão, 6 porcas apresentaram o mesmo título, em uma porca o título de anticorpos caiu e uma foi selecionada para ser morta. O alto título de anticorpos indicou que as porcas soronegativas tiveram uma prévia exposição ao PCV. Uma das porcas, além de desenvolver anticorpos contra PCV, deu nascimento a suínos com CT. Células renais originárias de um suíno com CT foram cultivadas e então foi

detectado circovírus. Esse vírus (PCV) isolado foi inoculado em porcas soronegativas durante a gestação e essas porcas deram origem a suínos com CT ao nascimento. Porcas não infectadas com PCV, produziram suínos normais ao nascimento. Esses resultados sugeriram que o PCV é a causa mais comum da forma do CT - Tipo AII (HINES & LUKERT, 1994).

3. OBJETIVOS

- 3.1. Padronizar técnicas de diagnóstico para o genoma e antígeno do circovírus suíno (PCV), assim como, anticorpo contra o agente;
- 3.2. Demonstrar a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares ao PCV;
- 3.3. Diagnosticar a infecção do PCV em animais do sistema de produção suína da Zona da Mata de Minas Gerais;
- 3.4. Isolar o PCV de amostras positivas.

4. CAPÍTULO I:

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)

4.1. INTRODUÇÃO

O PCV foi identificado em 1974 (TISCHER *et al.*, 1974) em células de rim de porco da linhagem celular PK15 (ATCC-CCL31), a qual é infectada cronicamente por este vírus. Embora suínos não apresentem sinais clínicos quando inoculados experimentalmente com PCV isolados de PK15 (TISCHER *et al.*, 1986), foram evidenciadas manifestações clínicas com o envolvimento deste agente (HINES & LUKERT, 1994; ALLAN *et al.*, 1998). No final da década de 90, foram demonstradas diferenças sorológicas e na seqüência de nucleotídeos entre o PCV isolado de PK15 daqueles isolados associados a síndromes degenerativas em suínos. Baseado nestas diferenças, MEEHAN *et al.* (1998) propuseram que o novo agente fosse classificado como circovírus suíno tipo 2 (PCV2), diferenciando-o do original isolado de PK15.

Baseado na sua morfologia e em seu DNA genômico circular de fita simples, o PCV isolado de células PK15 foi classificado na família *Circoviridae* (LUKERT *et al.*, 1995). Embora os circovírus têm sido identificados em uma ampla variedade de espécies animais (TODD *et al.*, 1990, 1991; RITCHIE *et al.*, 1989), o PCV isolado de células PK15 foi o primeiro circovírus de mamíferos encontrado.

MOROZOV *et al.* (1998) isolaram uma outra cepa de PCV de suínos que apresentavam a PMWS. Os suínos afetados mostraram uma severa

pneumonia intersticial. A seqüência completa de nucleotídeos (1768 nt) do genoma do PCV isolado foi determinada e comparada com a seqüência da cepa de PCV isolada de células PK15. A comparação da seqüência revelou diferenças significativas entre as duas cepas de PCV, com uma homologia total do DNA de 76%. As duas maiores ORFs foram identificadas, sendo a ORF1 a mais conservada entre as duas cepas, com 83% de homologia na seqüência de nucleotídeos e 86% de homologia na seqüência de aminoácidos. A ORF2 foi mais variável, com uma homologia na seqüência de nucleotídeos de 67% e uma homologia na seqüência de aminoácidos de 65%. Ensaio de PCR e hibridização *in situ* demonstraram DNA viral abundante em vários órgãos de suínos com a PMWS. Neste mesmo trabalho, testes de hibridização *in situ* demonstraram que o PCV2 teve como alvo vários órgãos e que esse vírus infectou principalmente macrófagos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais.

HAMEL *et al.* (2000) detectaram o PCV2 e PCV1 utilizando o teste de PCR. Os produtos de PCR de todas as amostras clinicamente positivas, detectadas pelo RFLP, demonstraram ser apenas PCV2. Pesquisadores têm usado o sistema de perfis RFLP na caracterização de isolamentos de PCV e se acredita que a epidemiologia molecular do PCV irá se beneficiar bastante com tal tipo de estudo.

O PCV se replica no núcleo de células infectadas produzindo uma forma replicativa de DNA fita dupla (RF dsDNA). A replicação é altamente dependente do metabolismo celular. A mitose é necessária para o transporte do DNA viral ao núcleo, além disso, as enzimas celulares da fase S do ciclo celular são ativas na síntese do DNA viral. A multiplicação do circovírus suíno foi induzida pelo tratamento de cultura de células infectadas com 300 mmol/L de D-glicosamina. Um dia após o tratamento com D-glicosamina foi observado um aumento no número de células contendo o antígeno viral, o qual foi superior a 50 vezes quando comparado

às culturas controles. A análise desse fenômeno mostrou que a replicação do DNA do PCV foi induzida. Apenas aminohexoses, mas não hexoses ou aminohexoses acetiladas foram eficazes. Foi também observado que a replicação viral depende da transferência do genoma viral ao núcleo no início da fase G1, pois quando transferido no final desta fase, não há replicação viral na fase S subsequente (TISCHER *et al.*, 1987).

CIACCI-ZANELLA *et al.* (2001) em um estudo, observaram que os vírus PCV1 e PCV2 não causaram efeitos citopáticos detectáveis (CPE) em cultura de células e detectaram as células infectadas pelo vírus por técnicas de imunocoloração.

ALLAN *et al.* (1994c) e TISCHER *et al.* (1982) fracassaram ao tentar detectar anticorpos contra PCV em soros de bovinos, carneiros, galinhas, perus, cabras, camundongos, coelhos e humanos usando ensaios de imunofluorescência indireta (IFI). Entretanto, contrário a esses achados, TISCHER *et al.* (1995), utilizando uma combinação das técnicas de ELISA e IFI, descreveram a detecção de baixos títulos de anticorpos contra PCV em humanos (30,2%), camundongos (12-69%) e bovinos (35%), sugerindo que os baixos níveis de reatividade encontrados nesses soros refletem a infecção de outras espécies relacionadas ao PCV.

A presença do antígeno de PCV na República da Irlanda foi demonstrada pela técnica de imunoperoxidase, na qual o anticorpo específico primário para PCV-2 foi usado (ALLAN *et al.*, 1998). Além disso, ácido nucléico do PCV-2 foi detectado no fígado pela técnica de PCR, utilizando oligos específicos. Resultados negativos foram obtidos por PCR quando oligos específicos para a cepa de circovírus suíno contaminante de cultura de célula original (PCV-1) foi usado (TISCHER *et al.*, 1982).

Assim foi proposta a padronização de técnicas para detecção molecular da presença de genoma de PCV (PCR) e de anticorpos (IFI), utilizando controles positivos e negativos eficientes.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Cultivo celular

Células das linhagens PK15, SK6, VERO e MDCK e também uma linhagem de células PK15, gentilmente cedida pela EMBRAPA, foram cultivadas no Laboratório de Virologia, Setor de Medicina Preventiva do Departamento de Veterinária/UFV. Essas células (PK15/Embrapa) foram obtidas a partir de um clone de PK15 livre de PCV1 inoculado com PCV2. As linhagens PK15 (ATCC, CCL-33) e SK6 (KASZA et al., 1972) são células derivadas de rim de suíno, as linhagens VERO (ATCC, CCL-81) e MDCK (ATCC, CCL-34) são compostas de células derivadas de rim de macaco e de cão, respectivamente.

Para o cultivo das células da linhagem PK15, foram utilizados meio DMEM (CULTILAB – Anexo 1) adicionado de D-glutamina 0,5 mM (SIGMA), piruvato 50 mM (SIGMA), aminoácidos não essenciais 1X (SIGMA) e soro fetal bovino 10% (SEROMED). No cultivo das células SK6, VERO e MDCK, o meio utilizado foi MEM (CULTILAB – Anexo 2) e SFB 10%. Em ambos os meios houve adição de penicilina 100 U/μL (SIGMA), estreptomicina 100 μg/mL (VETEC).

O cultivo foi realizado em estufa a 37°C com ambiente de CO₂ e a manipulação das células em capela de fluxo laminar. Após a monocamada de células atingir a confluência, o meio foi descartado e a monocamada foi lavada com tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, tripsinizada.

4.2.2. Purificação de DNA

A extração de DNA da monocamada de células foi executada utilizando-se culturas celulares PK15-PCV1, PK15/Embrapa, VERO, MDCK e SK6 infectadas ou não experimentalmente com amostras de tecidos de animais com suspeita de infecção por PCV2. Para cada extração, um frasco de 25 cm² contendo aproximadamente 3 x 10⁶ células foram imediatamente transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionada uma solução 1:1 de TE (TrisCl 10 mM, pH 8,0; 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 100 µg/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, foram acrescentados 0,4 volumes de acetato de amônia 5 moles/L (SIGMA) e 2 volumes de etanol 100% (SIGMA). O tubo foi centrifugado a 5000 x g durante 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o

precipitado de DNA viral lavado com etanol 70% por duas vezes. O precipitado foi seco e ressuspendido em um volume de 30 a 100 µL de água destilada estéril (MILLI Q) conforme o rendimento de DNA.

Com o propósito de controlar o padrão de extração, foi utilizado o sistema de extração comercial (QIAamp DNA Mini Kit - QIAGEN).

4.2.3. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram construídos a partir das seqüências conservadas entre a provável replicase do PCV não-patogênico (PCV1) e do PCV do CT (PCV2). A Tabela 1 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR.

Designação	Posição	Seqüência	Orientação
F110	110	5'-TCCGAGGAGGAGAAAAACAA-3'	"Foward"
F201	201	5'-CTCCTCACCTCCAGGGGT-3'	"Foward"
F426	426	5'-GGTCTTTGGTGACTGTAGGCCGA-3'	"Foward"
R516	516	5'- ATCTTCCCGCTCACTTTCAA-3'	"Reverse"
R751	751	5'-CTCTACAGTCAATGGATACCGGTCA-3'	"Reverse"

4.2.4. Amplificação por PCR

A mistura de reação para o ensaio de PCR foi preparada em água estéril (MILLI Q), consistindo de Tris-Cl 10 mM, pH 9,0 a 25°C (GIBCOBRL), KCL 50 mM (GIBCOBRL), MgCl₂ 1,5 mM (GIBCOBRL), 0,2 mM de cada um dos dNTPs (GIBCOBRL), 0,3 M de cada oligonucleotídeo (OPERON Tech., Inc.) e Taq DNA polimerase 10 U/mL (PHT). Alíquotas (23 µL) da mistura de reação foram colocadas em tubos de 0,2 mL. Após a

adição do DNA (2 μ L), a mistura foi transferida para um termociclador (MJC, Inc. PTC-100) pré-aquecido a 80°C. A reação de PCR foi processada iniciando com uma desnaturação a 94°C por 1 minutos e 35 ciclos, cada um deles consistindo de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e polimerização a 72°C por 1 minuto. A etapa final de extensão foi de 10 minutos a 72°C. As amostras amplificadas foram armazenadas a 4°C ou analisadas imediatamente.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta utilizando o padrão molecular ϕ X174-RF DNA/*Hae* III 0,1 μ g/mm (INVITROGEN).

4.2.5. Produção de conjugado anti-IgG suína

O soro de suíno foi diluído em 4 volumes de tampão acetato (ácido acético 0,6 M, pH 4,0) e o pH foi ajustado para 4,5 com NaOH (1M). A seguir foi adicionado o ácido caprílico (99% - SIGMA) gota a gota, sob agitação para uma concentração final de 25 μ L/mL. Centrifugou-se a solução por 30 minutos a 4°C a 15200 x g. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro. Após a filtração, foram misturados 9 volumes de sobrenadante com 1 volume de PBS 10X e o pH ajustado para 7,4 com NaOH (1M). Em seguida, a solução foi fracionada com sulfato de amônio (0,277 g/mL de solução) adicionado sob agitação à temperatura ambiente. Após a dissolução, a solução foi agitada novamente por 30 minutos a 4°C e centrifugada a 3000 x g durante 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10 volumes de PBS e mantido a 4°C. A proteína ressuspensionada foi dialisada “overnight” em 50-100 volumes de

PBS 1 X a uma temperatura de 4°C. O material dializado foi aquecido em banho-maria a 58°C por 20 minutos e centrifugado a 2000 x g a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado. Para a dosagem de IgG foram misturadas 20 volumes de solução de trabalho (Anexo 3) por volume de amostra a ser dosada, agitadas e incubadas à 60°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SmartSpec™ 3000-BIORAD) a 562 nm. O anticorpo anti-IgG suína foi produzido com a inoculação de três doses em coelho. O inócuo foi composto por IgG (1 mg/mL), adjuvante de Freund's (0,5% - Sigma) e H₂O. Na primeira inoculação foram homogeneizados em uma solução de igual volume de imunoglobulinas (1%) com adjuvante completo, sendo inoculados 0,2 mL em 4 pontos diferentes no dorso do animal via subcutânea, totalizando 0,8 mL por animal. A sangria de prova foi realizada 14 dias após a terceira inoculação e a precipitação da anti-IgG suína de coelho foi realizada como descrito acima. Após a quantificação, o conjugado foi marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para tal, foi utilizado 25 µg de FITC 90% (ALDRICH) para cada mg de proteína. O FITC foi dissolvido em Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9,0, em uma quantidade equivalente à metade do volume do antisoro em um tubo à parte. O antisoro foi mantido sob agitação e gotejado com Na₂HPO₄ 0,2 M em um volume correspondente a metade do volume inicial de antisoro. Em seguida, foi gotejado FITC (dissolvido anteriormente) sob a solução do antisoro e armazenado a temperatura ambiente por um período total de 75 minutos. Logo após a adição de FITC, o pH foi ajustado para 9,5 em Na₂HPO₄ 0,1 M e adicionada PBS (0,86%) em um volume correspondente a 4^a parte do volume do antisoro inicial. A solução total foi misturada brandamente a 25°C e deixada em repouso até completar 75 minutos. Após completado o período de repouso a solução foi centrifugada por 10 minutos a 2000 x g, o

precipitado desprezado e a solução sobrenadante foi dialisada em PBS 1 X, pH 6,0.

4.2.6. Imunofluorescência indireta (IFI)

Células infectadas foram testadas por IFI com soro policlonal hiperimune anti-PCV (VMRD, Inc.). Células PK-15 foram tripsinizadas 24 horas após o tratamento com D-glicosamina, ressuspendidas em 3,6 mL de uma solução contendo MEM e soro fetal bovino 10% e fixadas em lâminas de imunofluorescência com acetona resfriada. Após fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e água destilada e incubadas com o anticorpo primário policlonal (diluído 1:50, 1:100 e 1:1000 em PBS) a 37°C por uma hora. As culturas de células foram lavadas duas vezes com PBS e água destilada e imunocoradas com anticorpo secundário de coelho anti-suíno conjugado com FITC (diluído 1:10, 1:100 e 1:1000 em PBS) por 30 min a 37°C. Após a lavagem com PBS e água destilada, foi adicionado uma solução de Azul de Evans 0,01% para melhor visualização. As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Eclipse E600 - NIKON) com o objetivo de se detectar a presença da coloração fluorescente específica.

4.2.7. Análise de susceptibilidade de células

Diferentes linhagens celulares foram testadas para verificar a sua susceptibilidade ao isolamento de PCV. Para tanto, células PK15 foram

rompidas por congelamento e inoculadas em linhagem de células SK6, PK15/Embrapa, VERO e MDCK.

Dois frascos de 25 cm² de cada linhagem de células semiconfluentes foram inoculadas com 1 mL do inócuo e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ para adsorção do vírus por 24 horas. Em seguida, foram adicionados aos frascos 5 mL de MEM suplementado com soro fetal bovino 10% e antibióticos (item 4.2.1.) e a incubação prolongada por mais 48 horas. Logo após a incubação, as células foram tratadas com D-glicosamina 300 mM durante 45 minutos e incubadas por 48 horas (TISCHER *et al.*, 1987). Um dos frascos foi utilizado para a purificação de DNA, já as células do outro frasco foram transferidas para um frasco de 25 cm² 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 PCV.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Padronização de PCR para detecção de PCV2

A análise por PCR foi padronizada com os seis conjuntos de oligonucleotídeos disponíveis. O DNA extraído de células da linhagem PK15 demonstrou a existência do genoma do PCV1 quando foram utilizados todos os conjuntos de oligos (Figura 2A).

Com a padronização, foi confirmada a presença de uma cepa de PCV2 em células da linhagem PK15 cedidas gentilmente pela EMBRAPA (Figura 2B). Além disso, foi demonstrada a inexistência de PCV1 e 2 em células da linhagem SK6 (Figura 2B), VERO e MDCK (Figura 2C).

Os pares de oligos utilizados na Figura 2A demonstraram ser capazes de produzir fragmentos de tamanho esperado quando o genoma do PCV1 foi amplificado. Na Figura 2B, os oligos utilizados foram F110 e R751. Foi obtido um fragmento esperado de 641 pb no DNA das células PK15 e um fragmento de tamanho um pouco superior no DNA das células PK15 cedidas pela EMBRAPA. Nenhum produto foi observado na amplificação do DNA das células VERO e MDCK, quando comparado com o controle positivo (PK15; Figura 2C).

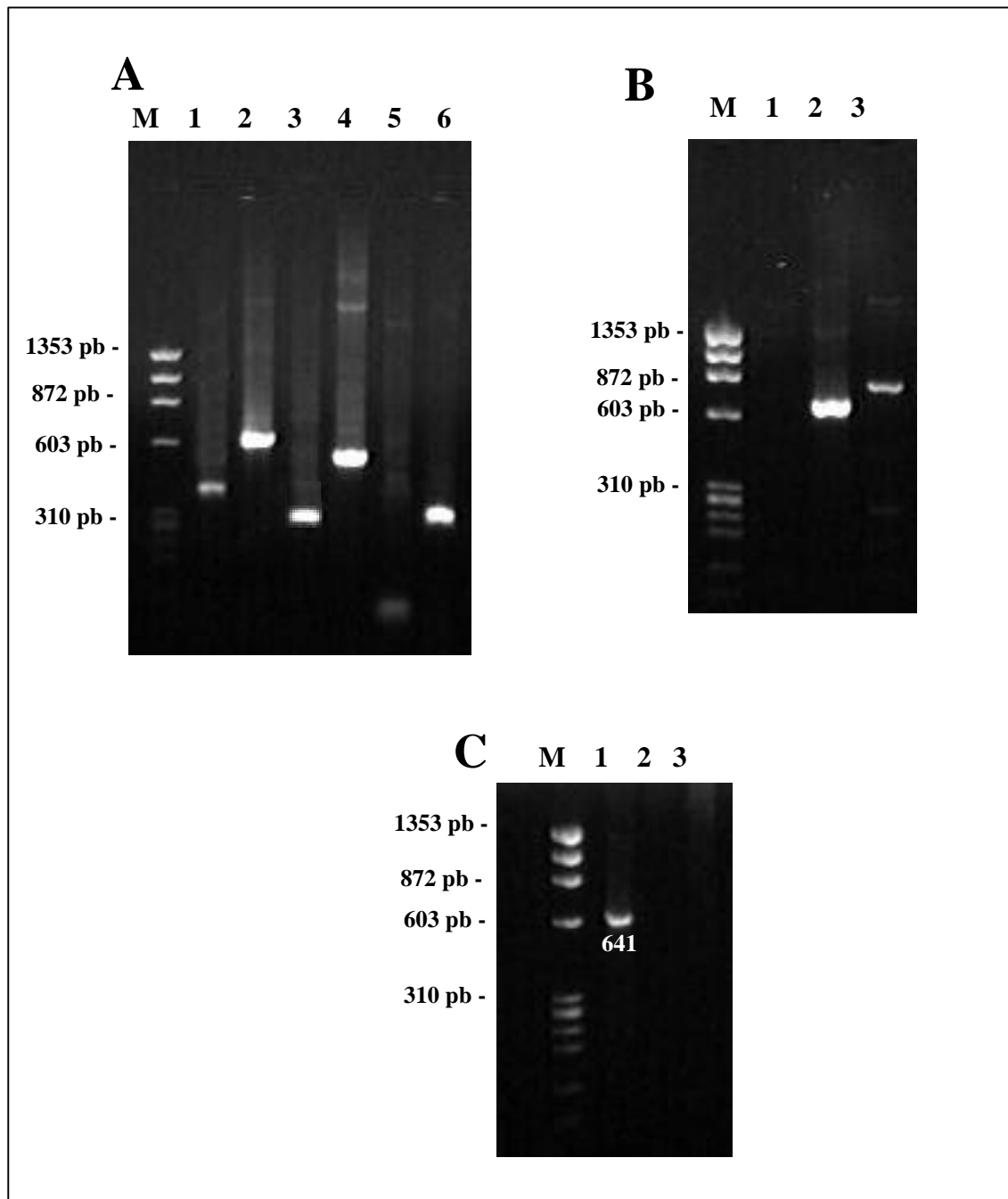


FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. (A) Detecção de DNA de PCV1 em células da linhagem PK15 usando seis conjuntos de oligos. Oligos F110 e R516 (linha 1), F110 e R751 (linha 2), F201 e R516 (linha 3), F201 e R751 (linha 4), F426 e R516 (linha 5) e F426 e R751 (linha 6). **(B)** Detecção de PCV em células da linhagens SK6 (linha 1), PK15 (linha 2) e PK15-PCV2 (linha 3). **(C)** Detecção de

DNA de PCV em células da linhagem PK15 (linha 1), VERO (linha 2) e MDCK (linha 3). M, ϕ X174-RF DNA/Hae III.

4.3.2. Susceptibilidade de diferentes linhagens celulares ao cultivo de PCV1.

Para verificarmos a susceptibilidade ao PCV1 de diferentes linhagens celulares, foram inoculadas células SK6, PK15/EMBRAPA, VERO e MDCK. A infecção pelo circovírus suíno foi confirmada por PCR após duas passagens seriadas em cada linhagem (Tabela 2).

Tabela 2. Susceptibilidades de diferentes linhagens celulares ao PCV (1 / 2)

Linhagem Celular	<i>PI</i> *	<i>S</i> **
PK15	+ (PCV1)	+/+
PK15/Embrapa	+ (PCV2)	+/+
SK6	-	+/+
VERO	-	+/?
MDCK	-	+/?

* Persistentemente Infectada; ** Susceptibilidade (PCV1 / 2)

Na Tabela 2 pode-se observar que a linhagem PK15 se encontra persistentemente infectada pelo PCV1, conforme descrito anteriormente (TischeR et al., 1974; ALLAN & ELLIS, 2000). Já na linhagem de células PK15/Embrapa, foi confirmada a presença de infecção persistente pelo PCV2. Células das linhagens SK6, VERO e MDCK foram negativas para a presença de DNA viral do PCV. Em todas as linhagens celulares testadas, o PCV1 causou infecção (Figura 3).

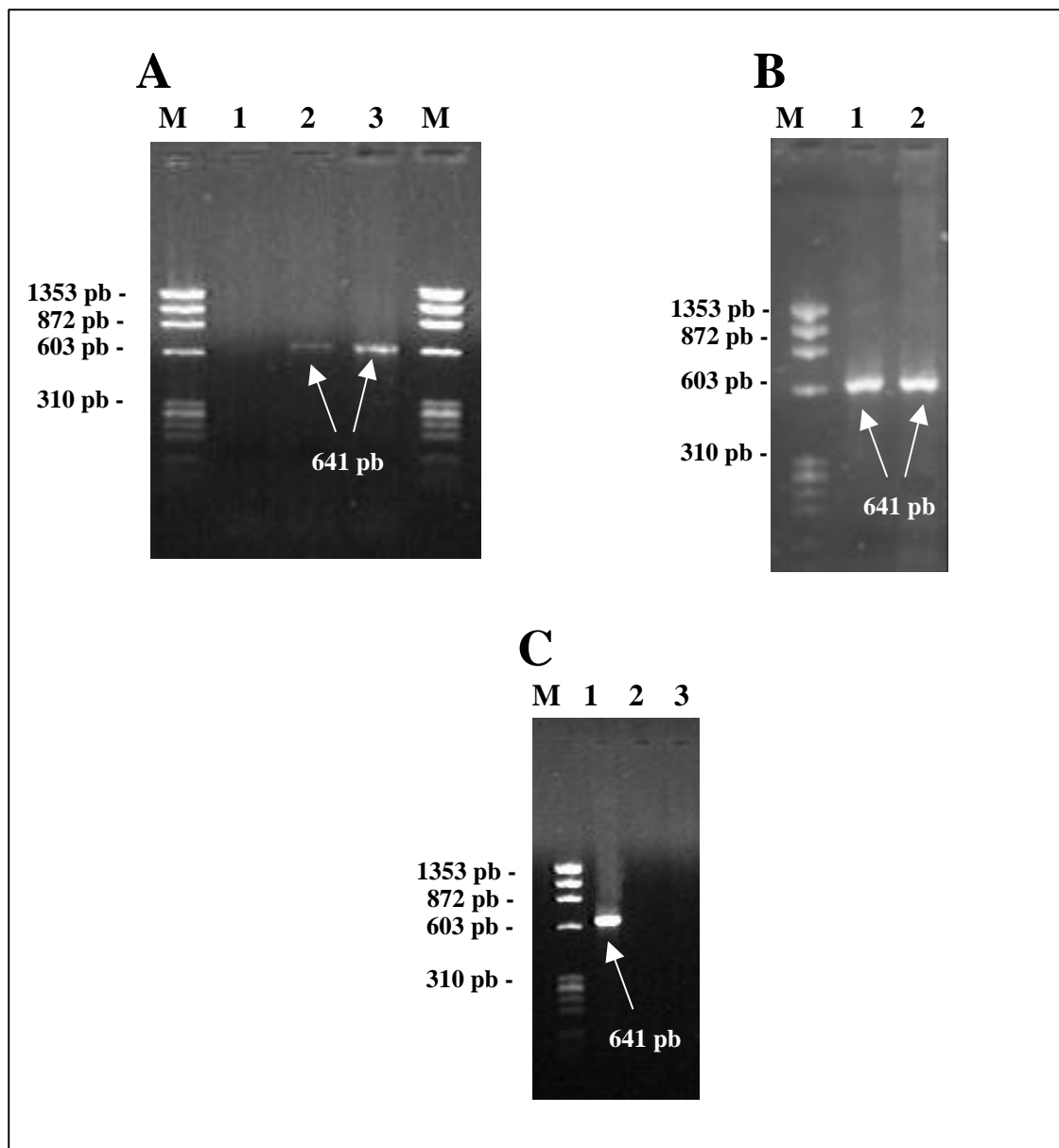


FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. Detecção de DNA de PCV em linhagens celulares. (A) Oligos F110 e R751. Linha 1, SK6; linha 2, SK6-PK15; linha 3, PK15. (B) Oligos F110 e R751. Linha 1, VERO-PK15; linha 2, MDCK-PK15; (C) Oligos F110 e R751. Linha 1, VERO; linha 2, MDCK; M, ϕ X174-RF DNA/Hae III.

A infecção persistente causada por PCV1 em PK15 e a ausência do genoma do vírus nas linhagens de SK6, VERO e MDCK podem ser

observadas na Figura 3 (A e C). Um fragmento semelhante ao detectado em células PK15 foi observado quando o DNA extraído de células das linhagens SK6, VERO e MDCK, após inoculação com o PCV1, foi amplificado (Figura 3, A e C).

4.3.3. Padronização de ensaio de Imunofluorescência Indireta

Para a padronização do ensaio de imunofluorescência, foi necessária a produção e titulação de conjugado anti-IgG suína. A titulação foi realizada através diluições seriadas do soro controle positivo e do conjugado, conforme descrito em Material e Métodos.

Os melhores resultados foram obtidos nas diluições 1:100 e 1:10 do soro controle positivo e do conjugado anti-IgG-suíno, respectivamente. No controle negativo da reação foi utilizado um soro bovino indicando que não há reação inespecífica (Figura 4, A e B).

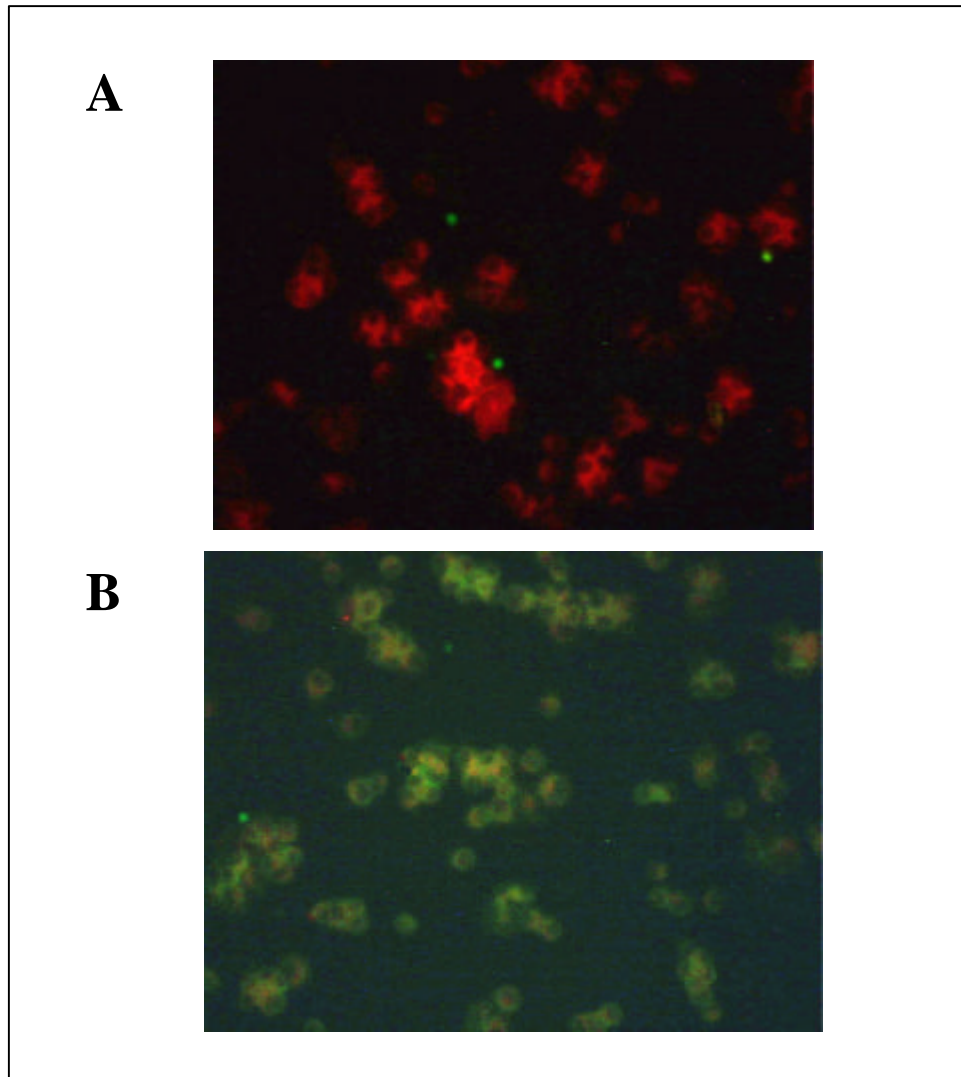


FIGURA 4. Microscopia eletrônica de fluorescência. Detecção de anticorpos contra PCV utilizando FITC. (A) Visualização de células PK15 com PBS (amostra negativa). (B) Visualização de células PK15 com soro controle positivo (suspeita PCV2).

Na Figura 4 em A, podemos observar que não houve reatividade devido a inexistência de anticorpos nas células. Diferentemente, em B as células aparecem com fluorescência devido a presença de anticorpos.

4.4. DISCUSSÃO

A biologia molecular tornou-se uma ciência utilizada para a evidenciação direta ou indireta dos agentes infecciosos desde a descoberta da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) (SAIKI, et al., 1985). À partir desta época, mudanças técnicas tem possibilitado a adaptação e o vislumbramento de novas aplicações de diversos autores que tem sido estimulados a imaginar modificações para as atividades dos virologistas, como agentes ativos, produtores e/ou adaptadores de novas tecnologias (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estes avanços nos métodos de diagnóstico de enfermidades com o advento da biologia molecular, permitem um estudo mais aprofundado dos organismos e sua relação com os hospedeiros e vetores, além de possibilitarem a abertura de novas vertentes no entendimento de aspectos evolutivos, na distribuição geográfica e na análise genética.

Atualmente, estas técnicas ainda são disponíveis em sua maioria para utilização de maneira rotineira nos laboratórios de referência e, conseqüentemente, ainda permanecem sem uma perspectiva a curto prazo de utilização pelos laboratórios de análises clínicas no diagnóstico de rotina, estando os seus diferentes protocolos em fase de desenvolvimento e adaptação. Estes protocolos variam quanto ao agente infeccioso a ser avaliado, as medidas para evitar a ação inibitória de enzimas diversas sobre a reação e a escolha das sequências de iniciadores da reação (primers) mais

adequados utilizando para isto sequências genéticas de diversos genes de diferentes vírus disponíveis sem custo para consulta e em constante crescimento, graças aos bancos mantidos pela comunidade científica.

Até o ano de 1996, existiam nos periódicos científicos indexados aproximadamente 40.000 artigos descrevendo o desenvolvimento e uso da técnica de PCR. Atualmente, temos em torno de 170.000 artigos sobre o tema, todavia, a utilização de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de enfermidades como procedimento de rotina em laboratórios de análises clínicas, especificamente PCR, RFLP, SSCP, PCR em tempo real e o PCR múltiplo tem permanecido restritas a exames para somente algumas viroses (hepatite B, hepatite C, herpes vírus, vírus do papiloma humano, citomegalovírus), bactérias (*Mycobacterium tuberculosis*) e linfoma, além de laboratórios de pesquisa e alguns laboratórios de referência e monitoramento de enfermidades. No diagnóstico de rotina em virologia, tanto humana quanto veterinária, ainda predomina a execução de outras técnicas moleculares, como as bioquímicas e imunológicas, associadas à microscopia ótica. Porém, proliferam relatos de adaptações para diferentes fontes de amostras e descrição de protocolos, com a disponibilização destes inclusive na internet (CARNEVALE, et al., 2000), além da apresentação de resultados, incorporando análises comparativas com outros métodos diagnósticos, para diversos agentes infecciosos.

As doenças relacionadas ao PCV2 vem surgindo de modo cada vez mais constante nos rebanhos nacionais, embora não existam relatos oficiais. A ocorrência dessas doenças vem sendo descrita por todo o mundo (ALLAN et al., 1994c; CIACCI-ZANELLA et al., 2001; CLARK, 1997; DAFT et al., 1996; EDWARDS & SANDS, 1994; HORNER, 1991; LeCANN et al., 1997; SÉGALES et al., 1997; TISCHER et al., 1982).

As viroses de caráter emergentes têm assumido uma grande importância tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento,

incluindo infecções novas, re-emergentes ou resistentes a medicamentos. Entre os anos de 1991 a 2000 um terço destas doenças foram originadas de animais e devido a sua diversidade, modos de transmissão complexos e a influência do envolvimento humano na perpetuação dos ciclos, estas infecções tem representado um desafio significativo para seu diagnóstico e controle.

Dentre as múltiplas facetas vislumbradas com esta nova maneira de realizar o diagnóstico, temos desde a utilização da PCR no seu modelo mais básico e de caráter somente qualitativo, até as mais recentes adaptações que permitem dosagens de cada amplificação ciclo a ciclo, e a combinação em uma mesma reação de iniciadores distintos, tendo como alvo diferentes agentes. Esta adaptação do método, talvez constitua-se em uma das adaptações de maior utilidade prática para este procedimento em um laboratório clínico para o diagnóstico de rotina num futuro não muito distante.

A habilidade do teste de PCR em realizar amplificação de seqüências específicas é particularmente útil para análise do DNA extraído de tecidos coletados. A qualidade do DNA extraído de tecidos armazenados (-70°C) depende de fatores como o tempo entre a coleta do tecido e o armazenamento e a quantidade variável de DNAses nos diferentes tecidos (GOELZ *et al.*, 1985). Atualmente, os protocolos de purificação de DNA e o teste de PCR são isentos de substâncias que possam vir a inibir as reações de amplificação. Contudo, em protocolos extensos ou em análises de um número muito grande de amostras, deve ser levado em consideração o maior risco de contaminação a cada passo de manipulação.

Um problema constante dessas técnicas de alta sensibilidade é a contaminação das amostras durante a coleta, extração do DNA, preparo do teste de PCR e análise por eletroforese. Portanto, deve-se tomar cuidado em

cada um desses passos, além de que, controles negativos devem ser incluídos em cada reação.

Os constantes resultados negativos obtidos em células das linhagens SK6, VERO e MDCK por meio de análise de PCR, na presença dos controles negativos utilizados, indicaram que reações falso positivas não foram problema em nosso trabalho.

Aqui, optou-se por padronizar técnicas de biologia molecular, de modo que possamos dispor de métodos de diagnóstico precisos para a detecção de PCV em amostras de campo. Assim, o teste de PCR detectou o DNA de PCV1 e 2 em culturas de diferentes linhagens celulares. Todos os oligos utilizados foram capazes de diferenciar PCV1 de PCV2, pois produziram fragmentos amplificados de tamanhos diferentes. Isto tornou possível a detecção simultânea de ambos os vírus em uma mesma amostra, utilizando-se os mesmos oligos.

No teste de susceptibilidade, foi confirmada a presença de PCV1 em cultura de células PK15 e de PCV2, isolado pela EMBRAPA, em cultura de células PK15 livres de PCV1. Com relação ao isolamento do PCV1 em linhagens de células derivadas de rim de macaco (VERO) e rim de cão (MDCK), observamos que essas diferentes linhagens celulares foram susceptíveis ao PCV1 e, possivelmente, ao PCV2, o que demonstra a extensa adaptação do vírus a diferentes espécies.

A IFI é uma técnica que se caracteriza pela possibilidade de utilização para a detecção de anticorpos ou de antígenos específicos. Uma dificuldade na implementação dessa técnica seria o alto custo do microscópio de fluorescência utilizado para a leitura dos resultados. Mas uma vez que o laboratório já disponha desse equipamento, a IFI pode ser a técnica de escolha, pois apresenta boa repetibilidade, operacionalidade e sensibilidade, associada a viabilidade econômica (HINES & LUKERT, 1994; MAGAR *et al.*, 2000; TISCHER *et al.*, 1995).

Apesar de ALLAN *et al.* (1994c) e TISCHER *et al.* (1982) fracassarem ao tentar detectar anticorpos contra PCV em soros de bovinos, carneiros, galinhas, perus, cabras, camundongos, coelhos e humanos usando ensaios de IFI, TISCHER *et al.* (1995), utilizando uma combinação das técnicas de ELISA e IFI, descreveram a detecção de baixos títulos de anticorpos contra PCV em humanos, camundongos e bovinos, demonstrando adequada sensibilidade da técnica mesmo para baixos níveis de reatividade.

Para o futuro, espera-se a utilização prática da técnica de PCR em diagnóstico de rotina e o desenvolvimento de testes comerciais, inclusive os baseados na aplicação de metodologia do PCR múltiplo com capacidade de identificação de uma grande gama de agentes infecciosos em um único ensaio, como um procedimento atrativo e de custo efetivo relativamente baixo para os laboratórios clínicos. A sua aplicabilidade porém, irá depender da disponibilidade de sistemas padronizados de detecção, incluindo métodos e protocolos para a coleta, preparação de amostras, detecção e identificação dos produtos de PCR (THOMPSON, *et al.*, 1999), devendo-se sempre ter em mente que para cada fonte diferente do material infeccioso (sangue, tecidos, fezes, vetores, solo e água) poderão surgir diferentes situações críticas de PCR, incluindo inibidores e diferenças na sensibilidade do ensaio utilizado. Atualmente, apesar de se conseguir um baixo custo individual por exame, o custo dos equipamentos associado a ausência de kits comerciais de rotina e ao conceito entre os prestadores de serviço em análises clínicas de que esta tecnologia além de não apresentar utilidade prática, ainda é muito cara, não sendo eficiente, específica ou sensível conforme desejado, tornando assim o uso destes ensaios baseados em biologia molecular distante dos procedimentos de rotina por mais algum tempo para o diagnóstico de enfermidades.

Reiteramos a necessidade futura da expansão da utilização da técnica de PCR, não deixando-a relegada unicamente aos laboratórios de pesquisa, mas sim melhorando-a tendo como meta a disponibilização em rotina para diagnóstico em laboratórios clínicos, o desenvolvimento, a adaptação e/ou o aprimoramento de protocolos buscando a detecção de estágios teciduais, particularmente em infecções latentes, a detecção de tecidos alvo além da possibilidade de se estudar a movimentação do agente infeccioso no organismo durante a infecção.

5. CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE CAMPO E ISOLAMENTO EM CÉLULAS SK6

IDENTIFICAÇÃO DE CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE CAMPO E ISOLAMENTO EM CÉLULAS SK6

5.1. INTRODUÇÃO

Baseado na sua morfologia e em seu DNA genômico circular de fita simples, o PCV isolado de células PK15 foi classificado numa família de vírus animal, a *Circoviridae* (LUKERT *et al.*, 1995). Embora os circovírus têm sido identificados em uma ampla variedade de espécies animais, (TODD *et al.*, 1990, 1991; RITCHIE *et al.*, 1989), o PCV isolado de células PK15 foi o primeiro circovírus de mamíferos encontrado. O PCV foi identificado em 1974 (TISCHER *et al.*, 1974) em células de rim de porco da linhagem celular PK15 (ATCC-CCL31), a qual é infectada cronicamente por este vírus.

A enfermidade conhecida como síndrome multisistêmica pós-desmame (PMWS) foi inicialmente descrita no Canadá em 1991 (CLARK, 1997; HARDING, 1997) e caracteriza-se por perda progressiva de peso, sinais respiratórios e icterícia. Os sinais menos comuns são diarreia, tosse e distúrbios do sistema nervoso central. Lesões macroscópicas incluem pneumonia intersticial granulomatosa, linfadenopatia, hepatite granulomatosa linfocítica e nefrite. A PMWS afeta primariamente suínos entre seis e 8 semanas de idade e raramente afeta suínos em fase de amamentação. Essa síndrome foi diagnosticada nos rebanhos negativos e

positivos para a síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), mas o diagnóstico de PMWS é complicado no rebanho positivo para PRRS devido às infecções secundárias. As taxas de morbidade e mortalidade em suínos pós-desmame foram bastante altas, chegando a 50% em populações de suínos (HARDING, 1997).

Segundo ALLAN & ELLIS (2000), o PCV2 foi associado a outras desordens em suínos, variando de abortos a fracasso na reprodução. Dados disponíveis na literatura indicam uma alta soroprevalência de anticorpos contra PCV2 em todo o mundo. O diagnóstico da doença associada ao PCV2 é baseado na demonstração direta de antígenos PCV2 ou de ácidos nucleicos nos tecidos afetados. O PCV2 é agora considerado como um patógeno emergente. Embora a transmissão vertical ter sido documentada (GUSTAFSON & KANITZ, 1974), a epidemiologia das infecções de PCV2 é pobremente entendida, assim como o papel da resposta imune no controle ou no aumento da doença.

MOROZOV *et al.* (1998) isolaram uma cepa de circovírus suíno (PCV) de suínos que apresentavam a PMWS. Ensaios de PCR e hibridização *in situ* demonstraram DNA viral abundante em vários órgãos de suínos com a PMWS. Neste mesmo trabalho, testes de hibridização *in situ* demonstraram que o PCV2 teve como alvo vários órgãos e que esse vírus infectou principalmente macrófagos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais.

ALLAN *et al.* (1995) descreveram os órgãos e tecidos envolvidos na replicação do PCV em infecções experimentais de suínos. Nesse estudo, a combinação de isolamento viral e imunocoloração foi usada para investigar o percurso do vírus após a infecção experimental em suínos jovens. O antígeno PCV foi detectado nas células de uma variedade de tecidos do sistema linfóide, pulmão e intestino. O vírus predominou nos tecidos do baço, timo, pulmão e foi associado com macrófagos/monócitos, histiócitos,

macrófagos tímicos e/ou células apresentadoras de antígenos. A associação do PCV com esses tipos celulares indica um possível papel patogênico para o PCV como um agente envolvido na disfunção imune em comum com outros membros da família *Circoviridae*. Nenhum antígeno PCV foi detectado em amostras de tecidos do sistema nervoso central e nenhuma anormalidade clínica foi observada em qualquer um dos suínos infectados experimentalmente.

LAROCHELLE *et al.* (2000) sugeriram através de um estudo de infecção experimental que o PCV2 poderia ser transmitido intermitentemente através de sêmen de reprodutores. A diferenciação de PCV1 e PCV2 em sêmen e em outros tecidos, pode ser obtida utilizando um “nested” PCR multiplex (KIM *et al.*, 2001; LAROCHELLE *et al.*, 1999).

HINES & LUKERT (1994), em uma revisão, revelaram que existem cinco causas do tremor congênito (CT) conhecidas. STEVENSON *et al.* (2001) descreveram que o CT tipo A2 está associado com o PCV e com a bainha de mielina deficiente e anormal. Suínos afetados com CT e normais foram selecionados de fazendas do centro-oeste dos EUA com até 48 horas após o nascimento. Todos os animais estavam infectados com PCV, largamente distribuído no SNC e fígado, porém, mais evidentemente, nas células do cérebro e medula espinhal, cujos neurônios se encontravam aumentados. Em tecidos não neurais, os macrófagos foram o tipo celular mais frequentemente infectado. As análises de PCR detectaram apenas a presença de PCV2 e não do PCV1 nos suínos infectados. Em todas estas fazendas, o surto de CT ocorreu na unidade de maternidade. Não foram observadas lesões grosseiras ou microscópicas em nenhum suíno com CT ou normal. Todos os testes para PRRSv, pseudorabies vírus e outros vírus causadores de efeito citopático foram negativos.

Atualmente, em granjas produtoras de suínos no estado de Minas Gerais, têm sido observados alguns casos que indicam a presença do tremor congênito em animais neonatos. Portanto, neste trabalho, foram utilizadas técnicas já padronizadas, com o intuito de detectar a presença do DNA de PCV2 em amostras de campo, bem como anticorpos contra esse agente.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Amostras

Um total de oito leitões, com até três dias de idade foram enviados de granjas do estado de Minas Gerais para o Laboratório de Virologia, Setor de Medicina Preventiva do Departamento de Veterinária/UFV entre 2001 e 2003. Amostras de cerebelo, cérebro, fígado, intestino delgado, linfonodo, pulmão e rim desses leitões foram coletadas em N₂ líquido e armazenadas a -70°C para posterior processamento. Além disso, 59 amostras de tonsilas e 45 amostras de soro sanguíneo, coletados aleatoriamente em animais abatidos em frigoríficos, foram estocadas a -70°C e -20°C, respectivamente, para processamento futuro. O abate dos leitões foi realizado mediante choque elétrico ou insensibilização mecânica no Setor de Necrópsia, Departamento de Veterinária/UFV.

5.2.2. Purificação de DNA

O DNA foi isolado diretamente das amostras de tecidos no Laboratório de Virologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV. Para cada extração, fatias do tecido congelado (aproximadamente 30 mg no total)

foram imediatamente transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e processadas conforme descrito previamente (item 4.2.2.). Com o propósito de controlar o padrão de extração, foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

5.2.3. Oligonucleotídeos

Neste trabalho foram utilizados apenas um dos pares de oligos disponíveis e padronizados anteriormente (item 4.2.3.).

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizadas foram as seguintes:

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR.

Designação	Posição	Seqüência	Orientação
F110	110	5'-TCCGAGGAGGAGAAAAACAA-3'	"Foward"
F426	426	5'-GGTCTTTGGTGACTGTAGGCCGA-3'	"Foward"
R751	751	5'-CTCTACAGTCAATGGATACCGGTCA-3'	"Reverse"

5.2.4. Amplificação por PCR

As análises por PCR foram realizadas conforme a padronização prévia (item 4.2.4.). Contudo, foram usados como controle positivo para o PCV, células da linhagem PK15 e, como controle negativo, células da linhagem SK6 além de controles negativos para verificação de contaminação nos reagentes, onde não houve adição de amostra.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (GIBCOBRL). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (SIGMA) e visualizado com luz ultravioleta, utilizando o padrão molecular ϕ X174-RF DNA/*Hae* III 0,1 µg/mm (INVITROGEN).

5.2.5. Isolamento viral

Amostras de tecidos foram homogeneizadas em MEM contendo penicilina (500 U/ μ L) e estreptomicina (500 μ g/ μ L). As amostras foram filtradas em uma membrana filtrante porosa de 0,22 μ m e estocadas para futuros estudos de inoculação.

Uma linhagem de células de rim de porco infectada persistentemente com PCV1 (PK15 - ATCC, CCL33) foi usada como controle positivo do PCV1, outra linhagem de PK15 infectada com PCV2 (PK15/Embrapa) como controle positivo do PCV2 e a linhagem SK6 (KASZA *et al.*, 1972), não infectada, como controle negativo.

O isolamento do vírus foi realizado em cultura de células SK6, já que foram mostradas serem livres e susceptíveis à infecção pelo PCV1 e PCV2. Dois frascos de 25 cm² de células SK6 semiconfluentes, contendo aproximadamente 3.10⁶ células, foram inoculadas com 1 mL do inócuo e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ para adsorção do vírus. Em seguida, foram adicionados aos frascos 5 mL do meio essencial mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino 10% mais antibióticos e a incubação foi prolongada por mais 48 horas. Logo após a incubação, as células foram tratadas com D-glicosamina 300 mmoles/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 cm² 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 detectar a presença de DNA do PCV.

5.2.6. Imunofluorescência indireta (IFI)

Os soros sanguíneos coletados de leitões com suspeita de CT e de animais abatidos em frigoríficos (item 5.2.1.) foram testadas por IFI em células SK6, previamente infectadas com PCV1, conforme descrito anteriormente (item 4.3.2.).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Análise de amostras de campo por PCR

Os oligos utilizados demonstraram ser capazes de diferenciar o PCV1 do PCV2 (item 4.3.1. – Figura 2B). Os resultados da amplificação por PCR de todas as amostras de campo (Figura 5) foram comparados com os produtos amplificados a partir de controles positivos para PCV1 (PK15), PCV2 (PK15/Embrapa) e com o controle negativo (células SK6), padronizados anteriormente (item 4.3.1.).

Na Figura 5, pode-se observar que os fragmentos amplificados de DNA proveniente de linfonodo de um leitão com diagnóstico de tremor congênito são de tamanho similar ao amplificado a partir de células PK15/Embrapa e de tamanho diferente do amplificado a partir de células PK15, independente do par de oligos utilizado.

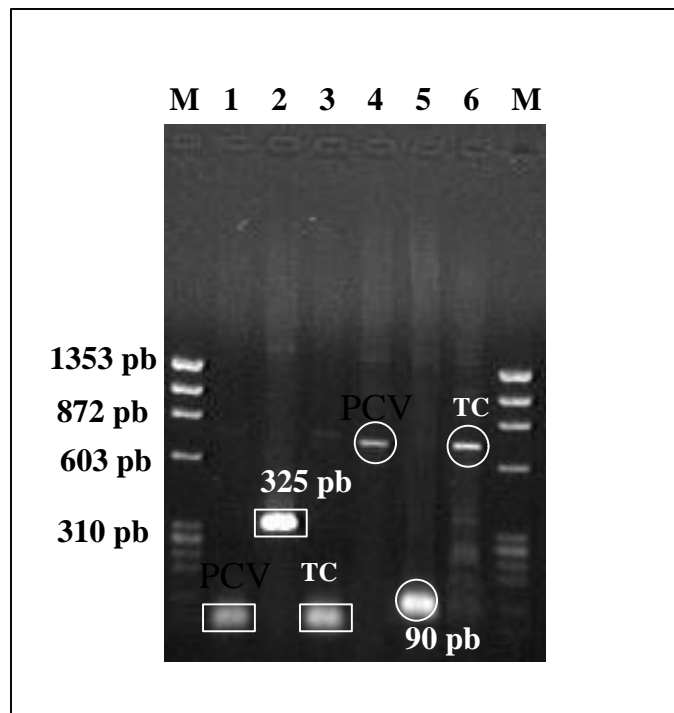


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. Amplificação de DNA de PCV em amostras de campo. Células PK15 (linhas 2 e 5) e PK15/Embrapa (linhas 1 e 4). As linhas 3 e 6 mostram a amplificação em amostras de animais com suspeita de tremor congênito (TC). M, ϕ X174-RF DNA/Hae III. Os fragmentos marcados com (O) foram amplificados utilizando-se os oligos F426 e R516 e nos fragmentos marcados com (ŷ) foram utilizados os oligos F426 e R751.

Dos oito leitões de maternidade sacrificados, quatro apresentaram sinais visíveis de tremor congênito que variavam de leves a severos. Apesar de somente metade dos animais terem apresentado sinais clínicos, em todos os oito foi confirmada a presença de PCV2 por análise de PCR.

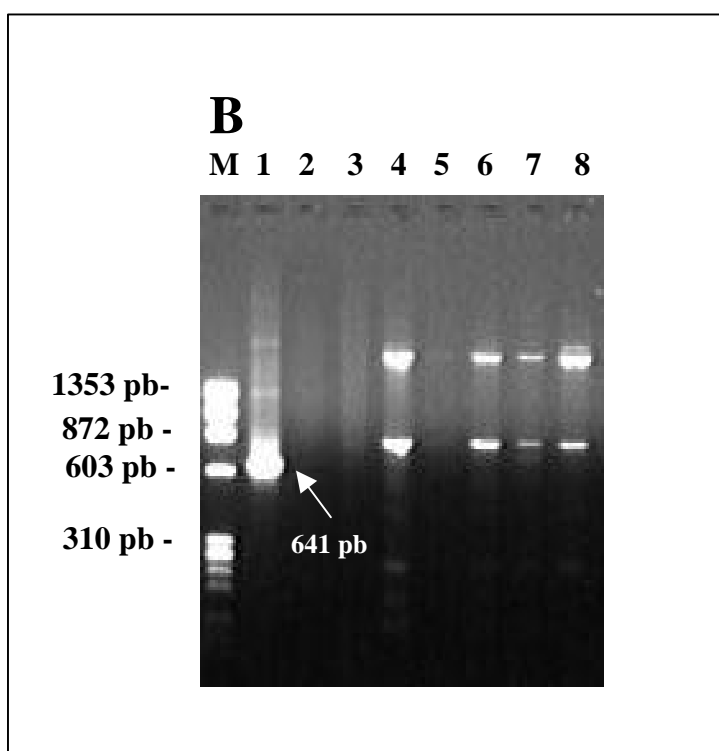


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. Amplificação de DNA de PCV. Oligos utilizados F110 e R751. Linha 1, PK15; linha 2, SK6 4; linhas 3 a 8, órgãos de um dos leitões com tremor congênito (linha 3, cérebro; linha 4, intestino delgado; linha 5, fígado; linha 6, linfonodo; linha 7, rim; linha 8, pulmão). M, ϕ X174-RF DNA/*Hae* III.

A prevalência do PCV2 foi observada no intestino delgado, linfonodos inguinais, pulmões e rins. Não foi demonstrada a presença do

genoma viral no cerebelo, cérebro e fígado (Figura 6). Em nenhuma amostra colhida dos animais foi detectada a presença do PCV1 por PCR.

Os resultados de amplificação por PCR de 59 amostras de tonsilas coletadas em animais adultos abatidos em frigoríficos no ano de 2002, utilizando os seis conjuntos de oligos, comprovaram a inexistência da infecção por PCV1 e 2 (Figura 7).

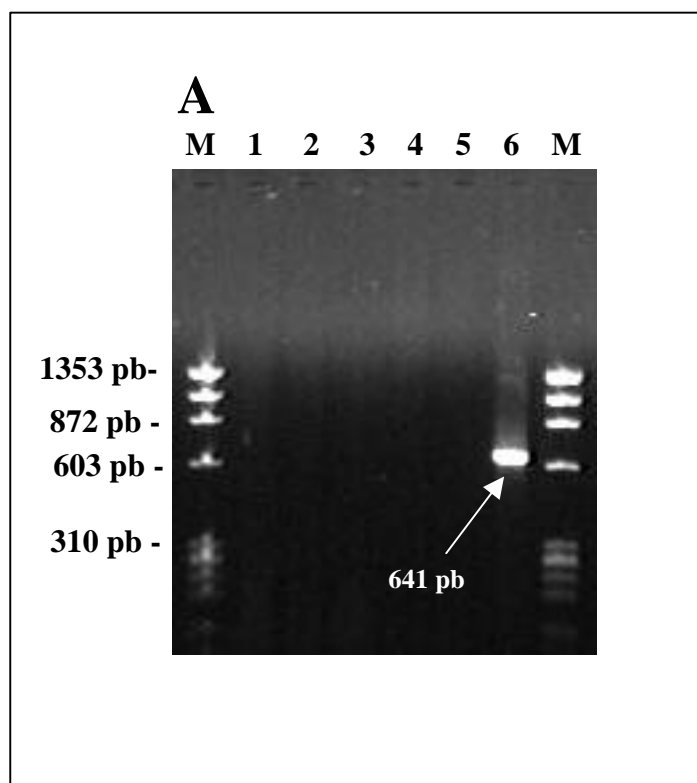


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. Amplificação de DNA de PCV. Oligos utilizados F110 e R751. Linhas 2 a 4, tonsilas de animais adultos; linha 5, SK6; linha 6, PK15. M, ϕ X174-RF DNA/*Hae* III.

Todas as 59 amostras coletadas de suínos abatidos em frigorífico foram analisadas por PCR, mas somente cinco delas foram representadas na Figura 7. Nessa figura pode-se observar a ausência de DNA de PCV1 e 2 nas amostras.

5.3.2. Imunofluorescência Indireta

Os resultados obtidos na imunofluorescência indireta indicaram a presença de anticorpos em 54,5% dos soros dos animais testados (Tabela 3).

Tabela 3. Detecção de anticorpos contra PCV por IFI.

Propriedades	Nº de animais testados	Nº de animais reativos	%
1	3	3	100,0
2	2	2	100,0
3	3	1	33,3
4	4	1	25,0
5	4	3	75,0
6	4	1	25,0
7	3	2	66,7
8	3	0	0,0
9	4	1	25,0
10	14	10	71,4
Total	44	24	54,5

Na Tabela 3, podemos observar uma alta proporção de animais apresentando anticorpos contra PCV em algumas propriedades (1, 2, 5 e 10). Somente na propriedade 8, os animais analisados não apresentaram anticorpos contra PCV detectáveis.

Quatro amostras de soro de leitões (3 a 4 dias de idade) com sinais clínicos de tremor congênito e positivos para PCV2 por PCR, foram testadas por IFI e nenhuma evidência de anticorpos contra PCV foi encontrada.

5.3.3. Isolamento viral

A análise de PCR demonstrou que a linhagem de células SK6 utilizada pelo laboratório era livre de PCV1 e 2, o que permitiu o isolamento de PCV1 proveniente do sobrenadante de cultura de células PK15 em células SK6 (item 4.3.2.). Baseado nos resultados dos testes de susceptibilidade descritos anteriormente foi realizado o isolamento de PCV2 presente nas amostras positivas detectadas por PCR (item 5.3.1.) em células SK6 (Figura 8).

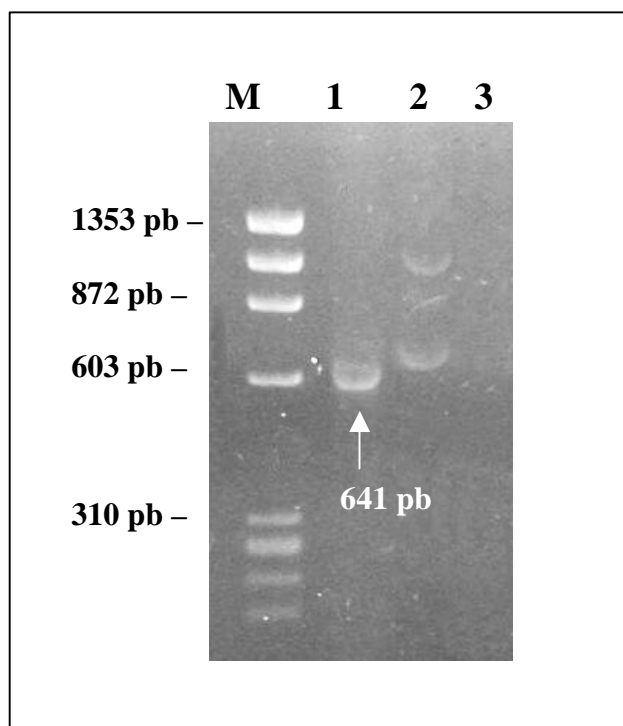


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. Amplificação de DNA de PCV. Oligos utilizados F110 e R751. Linha 1, PK15. Linha 2, SK6-TC. Linha 3, SK6 (controle negativo). M, ϕ X174-RF DNA/*Hae* III.

O isolamento de PCV2 foi realizado com a inoculação de amostras de tecido em células SK6 e, em seguida, foi analisado por PCR produzindo fragmentos de amplificação semelhantes aos encontrados na cultura de células PK15/Embrapa (Figura 8).

5.4. DISCUSSÃO

Até pouco tempo atrás, não havia nenhuma ligação definitiva entre a infecção de suínos pelo PCV e doença e, por isso, o PCV era considerado como um vírus não patogênico. Esse conceito só foi mudado a cerca de 5 anos atrás quando um novo PCV, designado PCV2, foi associado com várias síndromes presentes em suínos, como a PMWS e, a partir de então, o PCV2 foi reconhecido como um patógeno emergente. O PCV2 também foi associado a outras desordens em suínos, variando de abortos e fracasso na reprodução até a atípica PRRS (ELLIS *et al.*, 1998).

Pouco se sabe sobre o controle das doenças relacionadas ao PCV. Esses vírus são altamente resistentes à inativação por detergentes e desinfetantes comuns, tornando o processo de descontaminação difícil, se não impossível. Nenhuma vacina para o PCV é disponível até agora.

Sabe-se que o PCV1 é endêmico em populações de suínos através do mundo e as evidências até agora sugerem que a infecção de suínos com PCV2 pode ocorrer sem o aparecimento da doença. Existe também a possibilidade de que o PCV possa integrar no genoma do hospedeiro (TISCHER *et al.*, 1995). Além disso, embora grandes cuidados podem ser

tomados em laboratórios dedicados ao diagnóstico por PCR para evitar a contaminação cruzada, a possibilidade de contaminação de amostras de tecidos durante a necropsia seja nas granjas ou nos abatedouros é mais difícil de controlar.

Neste trabalho foi detectada a presença do PCV2 em 100% dos leitões de maternidade testados, dos quais 50% apresentavam sinais clínicos de CT. Em todos os leitões testados, o padrão de fragmentos amplificados foi idêntico ao obtido na amplificação do DNA de células PK15/Embrapa. A análise por PCR demonstrou ser capaz de detectar prontamente os PCV1 e 2. Contudo, a incidência de PCV1 em animais doentes parece ser extremamente baixa, conforme descrito na literatura (HINES & LUKERT, 1994).

Segundo HINES & LUKERT (1994), os produtores consultados observaram que alguns suínos afetados nunca recuperaram-se totalmente e continuaram a tremer durante a fase de crescimento e de terminação. Em observações de campo realizadas em granjas da região durante este trabalho, notou-se que todos os leitões de duas leitegadas apresentavam tremores que continuavam após o nascimento.

Os resultados desse estudo mostraram que dos quatro animais que não apresentaram sinais clínicos de tremor, mas que foram diagnosticados como positivos para PCV2, dois apresentaram aspecto saudável, com peso e condição corporal condizentes com a idade. Acredita-se que o PCV2 possa estar disseminado na maioria das propriedades da região da Zona da Mata mineira, mas que a doença só está se manifestando quando existe algum outro fator associado.

Dados disponíveis na literatura indicaram uma alta soroprevalência de anticorpos contra PCV2 em todo o mundo. Embora a transmissão vertical tem sido documentada, a epidemiologia das infecções de PCV2 é

pobrememente entendida, assim como o papel da resposta imune no controle ou no aumento da doença (ALLAN & ELLIS, 2000).

Nos animais de abate (59 suínos) procedentes de dez propriedades diferentes na Zona da Mata mineira, nenhuma evidência da presença do vírus foi encontrada. Já MOZOROV *et al.* (1998) ao isolarem uma cepa de PCV em suínos com a PMWS, demonstraram por hibridização *in situ* a presença de PCV2 em macrófagos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais. A detecção de anticorpos em 54,5 % dos soros coletados aleatoriamente de 44 animais de abate foram infectados em algum estágio da produção. Da mesma forma, a ausência de anticorpos nas amostras de soro sanguíneo de leitões, positivos quanto a presença de PCV2 por PCR, pode ser um indicativo da ocorrência do tremor congênito.

Inúmeros autores realizaram o isolamento de PCV2 em células PK15 livres de PCV1 (PK15-free; TISCHER *et al.*, 1987; MOZOROV *et al.*, 1998; ALLAN & ELLIS, 2000). Por o laboratório não dispor de células PK15-free e baseado no diagnóstico positivo para PCV2, optou-se pelo isolamento do vírus em células SK6, apesar da diferença na intensidade de banda do produto amplificado quando comparado ao produto obtido a partir de células PK15. O isolamento foi observado após duas passagens resultando em um tempo final de isolamento de 72 horas.

É interessante destacar que um surto de PCV2 relacionado à PMWS no Canadá (ELLIS *et al.*, 1998) ocorreu em rebanhos SPF onde a biossegurança estava bem estabelecida (ELLIS *et al.*, 1998; HARDING, 1997; HARDING & CLARK, 1997). Aparentemente, uma boa biossegurança, embora sempre recomendada, não assegura a ausência da doença associada ao PCV2. Um diagnóstico rápido, acurado e a remoção dos animais doentes de uma granja combinada com boas práticas de manejo poderiam ser apenas um método corrente de controlar as perdas atribuídas às infecções pelo PCV2. Portanto, estudos adicionais da

epidemiologia e da imunologia de infecções de PCV são necessários para o melhor entendimento e efetivo controle das doenças associadas com esse vírus.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. A técnica de PCR foi padronizada e testada para a detecção do genoma do PCV em diferentes tecidos de animais;
- 6.2. Células PK15, SK6, VERO e MDCK foram testadas quanto à susceptibilidade ao PCV e as células SK6 foram as escolhidas para a execução do isolamento viral;
- 6.3. A técnica de IFI foi padronizada e testada para a detecção do antígeno de PCV em soro sanguíneo;
- 6.4. Todos os leitões de maternidade testados (4 normais e 4 com tremor congênito) foram positivos quando para PCR, mas não apresentaram indícios de anticorpos, o que indica a presença da infecção e atesta a incapacidade desses animais de produzirem anticorpos nesta fase de vida;
- 6.5. Não foi detectada a ocorrência de infecção nos animais de abate testados por PCR, porém em % foram encontrados anticorpos contra PCV, indicando um contato prévio com o vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G. M. & ELLIS, J. A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(1): 3-14.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARK, E. D.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B. M. & ADAIR, B. M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 3-10.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J.P.; REILLY, G.A.C.; ADAIR, B.M.; ELLIS, W.A. & McNULTY, M.S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Veterinary Microbiology*, 44: 49-64.

ALLAN, G. M.; MACKIE, D. P.; McNAIR, J.; ADAIR, B. M. & McNULTY, M. S. (1994a). Production, preliminary characterization and applications of monoclonal-antibodies to porcine circovirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 43: 357-371.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; FOSTER, C. & ADAIR, B. M. (1994b). Infection of leucocyte cell cultures from different species with porcine circovirus. *Veterinary Microbiology*, 41: 267-279.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D. & McNULTY, M. S. (1994c). Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine*, 41: 17-26.

- BUHK, H. J.; BLAB, I. & TISCHER, I. (1988). Replication of negative strand DNA of the single-stranded porcine circovirus genome. *In Abstr Join Meeting of Sektio Virologie and Virus Group of Society of Genetic and Microbiology*, 1: 54.
- BUHK, H. J.; TISCHER, I. & KOCH, M. A. (1985). Cloning and sequencing of the porcine circovirus PCV genome. *Zentralblatt fuer Bakteriologie Mikrobiologie and Hygiene series A, Meeting. Abstract*, 260, 465.
- CARNEVALE, S.; VELASQUEZ, J. N.; LABBE, J. H.; CHERTCOFF, A.; CABRERA, M. G. & RODRIGUEZ, M. I. Diagnosis of Enterocytozoon bienersi by PCR in stool samples eluted from filter paper disks. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology*, 7 (3) 504-506.
- CHEUNG, A. K. (2003). Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus Type 2. *Virology*, 305: 168 –180.
- 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 (2): 151-3.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. & MORÉS, N. (2001). Diagnóstico da Síndrome Multisistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil Causada pelo Circovírus Suíno Tipo 2. *Comunicado Técnico – EMBRAPA – CNPSA*, 270: 1-3.
- CLARK, E. G. (1997). Pos-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, 28: 499-501.
- DAFT, B.; NORDHAUSEN, R. W.; LATIMER, K. S. & NIAGRO, F. D. (1996). Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. *39th Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Little Rock, Ar, USA, p.32.
- DULAC, G. C. & AHMAD, A. (1989). Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53: 431-433.

- EDWARDS, S. & SANDS, J.J. (1994). Evidence of circovirus infection in British pigs. *Veterinary Record*, 134: 680-681.
- ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN K.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D. & HAINES, D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, 39: 44-51.
- FRANZA, B. R.; RAUSCHER, F.J., JOSEPHS, S.F. & CURRAN, T. (1988). The fos complex and Fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*, 239:1150-1153.
- GOELZ, S. E.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B. (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochemical and Biophysical Research Community*. 130: 118-126.
- GUSTAFSON, D. P. & KANITZ, C. L. (1974). Experimental transmission of congenital tremors in swine. *Proceeding US Animal Health Association*, 78:338-345.
- HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E. & NAYAR, G. P. (2000). PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64(1):44-52.
- HARDING, J. C. (1997). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, 28th Annual Meeting, Quebec City, Canada*, p.503.
- HARDING, J. C. & CLARK, E. G. (1997). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.*, 5:201-203.
- HESS, J.L.; SMALL, J A. & CLEMENTS, JE. (1989). Sequences in the visnavirus long terminal repeat that control transcription activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *Journal of Virology*, 63: 3001-3015.

- HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; KAMMANN, M.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. (1993). Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *EMBO Journal*, 12: 4445-4452.
- HINES, R. K. & LUKERT, P. D. (1994). Porcine Circovirus as a Cause of Congenital Tremors in Newborn Pigs. *In Process American Association Swine Practice, Chicago*, III: 344-345.
- HORNER, G. W. (1991). Pig circovirus antibodies present in New Zealand. *Surveillance (Wellington)*, 18:23.
- JEANG, K. T.; CHIU, R.; SANTOS, E. & KIM, S.J. (1991). Induction of the HTLV-1 LTR by Jun occurs through the tax-responsive 21-bp elements. *Virology*, 181:218-227.
- KASZA, L.; SHADDUCK, J. A.; CHRISTOFINIS, G. J. (1972). Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. *Research Veterinary Science*, 13(1):46-51.
- KIM, J.; HAN, D. U.; CHOI, C. & CHAE, C. (2001). Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 98:25-31
- KOONIN, E. V. & ILYINA, T. V. (1993). Computer assisted dissection of rolling circle DNA replication. *BioSystems*, 30: 241-268.
- 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.
- LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MÜLLER, P. & MAGAR, R.. (2000). PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of Clinical Microbiology*, December 2000: 4629-4632.
- LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M. & MAGAR, R.. (1999). Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 80: 69-75.

- LeCANN, P.; ALBINA, E.; MADEC, F.; CARIOLET, R.; & JESTIN, A. (1997). Piglet wasting disease. *Veterinary Record*, 141: 660.
- LEE, W.; HASLINGER, A.; KARIN, M. & TIJIAN, R. (1989). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV 40. *Nature*, 325:368-372.
- LUKERT, P. D.; DE BOER, G. F.; DALE, J. L.; KEESE, P.; McNULTY, M. S.; RANGLES, J. W.; & TISCHER, I. (1995). The *Circoviridae*. In *Virus Taxonomy: Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers. *Vienna and New York: Springer Verlag*, 1: 166-168.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E. & JESTIN, A. (2000). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, 63: 223–233.
- MAGAR, R.; MULLER, P. & LAROCHELLE, R. (2000). Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Canadian Journal Veterinary Research*, (64) 3: 184-186.
- MANKERTZ, A. & HILLENBRAND, B. (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology*, 279: 429-438.
- MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G. & TOOD, D. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal General Virology*, 71:2562-2566.
- MARTIN, M. E.; PIETTE, J.; YANIV, M.; TANG, W. J. & FOLK, W. R. (1988). Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proceedings of Natl. Academy Science USA*, 85:5839-5843.

- McNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; FOSTER, J. C.; ADAIR, B. M. & McNULTY, M. S. (1996). Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49:295-306.
- MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V. A.; ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M. & ALLAN, G. M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 79: 2171-2179.
- MEEHAN, B. M.; CRELLAN, J. L.; McNULTY, M. S. & TODD, D.(1997). Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *Journal of General Virology*, 78: 221-227.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. & PAUL, P. S. (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9):2535-2541.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. GenBank. [2003]. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- NAYAR, G. P. S.; HAMEL, A. & LIN, L.(1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Canadian Veterinary Journal*, 38: 385-386.
- NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S. R.; HARMS, P. A.; SORDEN, S. D. & PAUL, P. S. (2000b). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, 81: 2281-2287.
- RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; LUKERT, P. D.; STEFFENS, W. L. & LATIMER, K. S. (1989).Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease virus. *Virology*, 171: 83-88.

- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- SANCHEZ JR, R. E.; NAUWYNCK, H. J.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. M. & PENSAERT, M. B. (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology*, 83: 169-176.
- SEGALÉS, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DELPOZO, M.; NOVAL, R.; SACRISTAN, C.; DELASHERAS, A.; FERRO, A. & LATIMER, K. S. (1997). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record*, 141: 600-601.
- STANLEY, J. (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, 206:707-712.
- 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.
- STEVENSON, G. H.; KIUPEL, M.; MITTAL, S. K.; CHOI, J.; LATIMER, K. S. & KANITZ, C. L. (2001). Tissue and genetic type of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostics Investigation*, 13: 57-62.
- THOMPSON, R. C. (1999). Veterinary parasitology: looking to the next millennium. *Parasitology Today*, 15: 320-325.
- TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S. & GERMANN, B. (1995). Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Archive of Virology*, 140: 737-743.
- TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; & POCIULI, S. (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archive of Virology*, 96:39-57.

- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M. & GRIEM, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archive of Virology*, 91: 271-276.
- TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W. & KOCH, M. A. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295: 64-66.
- TISCHER, I.; RASCH, R. & TOCHTERMANN, G. (1974). Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell line. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A)*, 226: 153-167.
- TODD, D.; CREELAN, J. L.; MACKIE, D. P.; RIXON F. & McNULTY, M. S. (1990). Purification and Biochemical characterization of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology*, 71: 819-823.

ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSIÇÃO DULBECCO MEM (DMEM)

Sais Inorgânicos	mg/L	L-serina	42,00
CaCl ₂ H ₂ O	265,00	L-treonina	95,00
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,10	L-triptofano	16,00
KCL	400,00	L-tirosina	104,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00	L-valina	94,00
NaCL	6.400,00		
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125,00	VITAMINAS	mg/L
NaHCO ₃	3.700,00	Cloreto de Colina	4,00
		pantotenato de cálcio	4,00
Aminoácidos	mg/L	ácido fólico	4,00
L-arginina.HCL	84,00	inositol	7,20
L-cistina	62,57	nicotinamida	4,00
L-glutamina	548,00	piridoxal.HCL	4,00
glicina	30,00	riboflavina	0,40
L-histidina.HCL.H ₂ O	42,00	tiamina.HCL	4,00
L-isoleucina	105,00		
L-leucina	105,00	Outros Componentes	mg/L
L-lisina.HCL	146,00	glicose	1.000,00
L-metionina	30,00	piruvato de sódio	110,00
L-fenilalanina	66,00	vermelho de fenol	15,00

Fonte: Cultilab

ANEXO 2

COMPOSIÇÃO MEIO MEM

Sais Inorgânicos	mg/L	L-metionina	15,00
CaCl ₂ .H ₂ O	264,87	L-fenilalanina	32,00
KCl	400,00	L-prolina	11,50
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00	L-serina	10,50
NaCl	6.800,00	L-treonina	48,00
NaHCO ₃	2.200,00	L-triptofano	10,00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	140,00	L-tirosina	52,10
		L-valina	46,00
AMINOACIDOS	mg/L	VITAMINAS	
L-alanina	8,90	pantotenato de cálcio	1,00
L-arginina.HCl	126,00	cloreto de colina	1,00
L-asparagina	15,00	ácido fólico	1,00
L-ácido aspártico	13,30	inositol	2,00
L-cistina	31,29	nicotinamida	1,00
L-ácido glutâmico	14,70	piridoxal.HCl	1,00
L-glutamina	292,00	riboflavina	0,10
glicina	7,50	tiamina.HCl	1,00
L-histidina.HCl.H ₂ O	42,00	Outros Componentes	mg/L
L-isoleucina	52,00	glicose	1.000,00
L-leucina	52,00	vermelho de fenol	10,00
L-lisina.HCl	72,00		

Fonte: Cultilab

ANEXO 3

SOLUÇÃO DE TRABALHO:

98% do Reagente A

4% do Reagente B

Reagente A:

1% de BCA.Na_2 (SIGMA)

2% $\text{Na}_2\text{CO}_3.\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)

0,16% Tartarato de Sódio. $2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)

0,45% NaOH (SIGMA)

0,95% NaHCO_3 (SIGMA)

100 mL H_2O

Obs.: Ajustar o pH para 11,25 com NaOH 50%

Reagente B:

4% $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)

100 mL H_2O

A solução de trabalho é estável por uma semana, mas recomenda-se que seja preparada no momento do uso.