

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

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE
PARA A CIRCOVIROSE SUÍNA E ENSAIOS PARA
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PCV2**

DIOGENES DEZEN

Porto Alegre

2011

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

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE
PARA A CIRCOVIROSE SUÍNA E ENSAIOS PARA
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PCV2**

DIOGENES DEZEN

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, área de concentração Microbiologia.

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**

Co-orientador: **Dr. Franciscus A.M Rijsewijk**

Porto Alegre

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Dezen, Diogenes

DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE PARA A
CIRCOVIROSE SUÍNA E ENSAIOS PARA DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE PCV2 / Diogenes Dezen. -- 2011.
121 f.

Orientador: Paulo Michel Roehe.

Coorientador: Franciscus Antonius Maria
Rijsewijk.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2011.

1. circovirus suíno tipo 2. 2. PCR em tempo real.
3. PCR competitivo. 4. vacina recombinante. I.
Roehe, Paulo Michel , orient. II. Rijsewijk,
Franciscus Antonius Maria, coorient. III. Título.

Diogenes Dezen

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA RECOMBINANTE PARA A
CIRCOVIROSE SUÍNA E ENSAIOS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
PCV2.**

Aprovado em 24 de março de 2011.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe (ICBS/UFRGS)
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Janice Ciacci Zanella (EMBRAPA/CNPISA)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal (FAVET/UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti (ICBS/UFRGS)
Membro da Comissão

De todas as dificuldades que enfrentei na confecção deste manuscrito me deparei com uma que foi a maior, a de inserir apenas duas palavras. Apesar de serem curtas, elas levam um significado profundo, por isso confesso que custei a escrevê-las, relutei e por vezes não o quis fazer, na esperança de que tudo fora um mal entendido. As palavras as quais me refiro são *in memoriam*. É difícil saber que você já não se encontra mais entre nós, mas esteja onde estiver, que fique aqui meu registro de gratidão e amizade. Por isso este trabalho é dedicado ao meu co-orientador e estimado amigo Franciscus Rijsewijk, que partiu antes da conclusão desta tese e que deixou saudades.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o sentimento pelo qual reconhecemos a importância do outro em nossas vidas. Por isso, não posso deixar de manifestar o quão importante foram e são os amigos, colegas, familiares e colaboradores, que me auxiliaram nesta jornada.

Devo agradecer em especial ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo M. Roehle**, por viabilizar a execução dos experimentos, por estimular o livre pensamento e por argumentar de forma crítica e decisiva na redação dos manuscritos.

Em memória ao meu co-orientador, **Dr. Franciscus A. M. Rijsewijk** (Laboratório de Virologia, ICBS – UFRGS), pelo coleguismo e experiência profissional prestada, e principalmente por seu entusiasmo pela ciência, o qual serviu de exemplo e motivação para minha pessoa.

À **Prof. Dra. Ana Cláudia Franco** (Laboratório de Virologia, ICBS – UFRGS), por coordenar o laboratório de modo a contribuir no andamento dos projetos.

Ao **Prof. Dr. David Driemeier** (Setor de Patologia, FAVET – UFRGS), pelas amostras de tecido suíno cedidas.

À **Tatiane Shäffer Gregianini** (FEPPS), que auxiliou na execução dos testes de quantificação de DNA viral através da técnica de PCR em tempo real.

Aos membros da comissão avaliadora desta tese, doutores **Amauri S. Braga**, **Cláudio W. Canal** e **Janice R. Ciacci-Zanella**, por aceitarem o convite e se disponibilizarem em contribuir com sugestões para o manuscrito.

Aos meus pais, **Antônio** e **Angela Dezen**, que mesmo estando longe, sempre se fizeram presentes, apoiando e respeitando minhas decisões, me aconselhando e me estimulando a lutar pelos meus objetivos.

À minha esposa, **Viviane**, que vibrou com minhas conquistas, me apoiou em momentos difíceis e agüentou minhas variações de humor durante todo doutorado. Obrigado por estar sempre ao meu lado, juntamente com meu fiel escudeiro, **Sammy**, nosso pinscher de estimação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Virologia (IPVDF e ICBS): **Ana**, **Thais**, **Fabrcio**, **Willia**, **Lissandra**, **Samuel**, **Hiran**, **Dadá**, **Cenci**, **Esmaille** e **Helton**. Obrigado pelo companheirismo, troca de idéias, apoio, churrascos, cafezinhos e mates. Foi muito bom conviver estes anos todos com vocês, continuo ainda me sentindo parte integrante do grupo, embora hoje esteja longe fisicamente.

À **Angela Patrícia Medeiros Veiga** (IFC – Campus Concórdia), por ter contribuído com correções deste manuscrito.

Aos demais **colegas do IPVDF** que permitiram a realização de meus experimentos na instituição, bem como meu alojamento no período de doutorado.

Ao **PPGCV/UFRGS**, pela oportunidade de realização desta tese.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para que a realização desta tese se tornasse possível, meu muito obrigado.

*“Tornamos nosso mundo mais significativo pela
coragem de nossas perguntas e pela
profundidade de nossas respostas.”*

Trecho extraído do livro “Cosmos”
de **Carl Sagan**.

Desenvolvimento de uma vacina recombinante para a circovirose suína e ensaios para diagnóstico molecular de PCV2

RESUMO

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é o principal agente da síndrome multissistêmica do definhamento do suíno (SMDS), uma doença mundialmente disseminada e que provoca perdas econômicas significativas para a suinocultura. Visando contribuir no diagnóstico da síndrome, o presente trabalho padronizou e comparou testes para a detecção do PCV2. Para isso, foram utilizadas as técnicas de amplificação por círculo rolante (ACR) e variações da PCR (convencional, tempo-real e competitiva). Utilizando a ACR foi possível obter a amplificação total de genomas do PCV2, os quais foram clonados, sequenciados e agrupados no genótipo PCV2b. Os genomas clonados foram isolados, recircularizados e transfectados em células PK-15. Este procedimento possibilitou a recuperação do vírus infeccioso em títulos de até $10^{5,55}$ DICC_{50/mL}. Portanto, a ACR foi uma ferramenta útil em estratégias de isolamento e sequenciamento do vírus. No entanto, a ACR foi menos sensível que a PCR para fins de detecção do PCV2. No segundo estudo, buscando métodos auxiliares no diagnóstico da SMDS, dois ensaios para a quantificação do PCV2 foram desenvolvidos. Estes ensaios foram baseados nas técnicas de PCR competitivo (cPCR) e de PCR em tempo real. Visando determinar qual seria o mais adequado para estimar a carga viral do PCV2, os dois métodos foram comparados. Ambos os ensaios foram capazes de detectar diferenças significativas entre o número de cópias de DNA de PCV2 encontradas em tecidos de animais saudáveis e acometidos pela SMDS ($\geq 2,5 \log_{10}$). No entanto, uma diferença média de $1,8 \log_{10}$ na carga viral foi encontrada entre ensaios, onde as maiores cargas virais foram detectadas pela PCR em tempo real. Outro objetivo deste trabalho foi gerar vacinas baseadas na proteína do capsídeo (Cap) do PCV2. Assim, no terceiro estudo, três baculovírus recombinantes foram construídos de modo a expressar a proteína Cap. Em dois recombinantes, a seqüência de nucleotídeos do peptídeo sinal (PS) da glicoproteína I do herpesvírus bovino (BoHV-gI) foi inserida na extremidade 5' do gene *cap* (ORF2). Além disso, um recombinante contendo a seqüência de nucleotídeos do PS foi construído sem o sinal de localização nuclear (NLS) de proteína Cap. Através do ensaio de imunoperoxidase em monocamada (IPMA), antígenos de PCV2 foram detectados em células Sf21 infectadas pelos três vírus recombinantes. Este resultado sugere que os recombinantes construídos são potenciais candidatos vacinais, uma vez que eles foram capazes de produzir antígenos de PCV2.

Palavras-chave: PCV2, vacina, SMDS, ACR, PCR em tempo real, PCR competitivo, baculovírus.

Development of a recombinant vaccine for porcine circovirus associated disease and molecular assays to detect PCV2

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the major agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), a worldwide spread disease that causes significant economic losses to the swine productive chain. Aiming to contribute in the diagnosis of the syndrome, this thesis compared and developed tests for PCV2 detection. For this, multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) and PCR-based assays (conventional, real-time and competitive) were tested. The MPRCA allowed amplifying the full-length PCV2 genomes, which were cloned, sequenced and grouped on PCV2b genotype. The cloned genomes were isolated from the plasmids, recircularized and used for transfection in PK-15 cells. This procedure led to the production of infectious virus to titres up to $10^{5.55}$ TCID_{50/mL}. It was concluded that MPRCA is a useful tool to amplify PCV2 genomes in sight of sequencing and virus isolation strategies. However, it was less sensitive than PCR for diagnostic purposes. In the second study, searching for methods in support to PMWS diagnosis, two PCR assays were developed: a competitive PCR (cPCR) and a SYBR green real-time PCR. The quantitative PCR methods were compared to determine which would be more suitable to estimate the PCV2 DNA load. Both assays were able to detect significant differences between the numbers of PCV2 DNA copies found in tissues of PMWS-affected and non-PMWS-affected pigs ($\geq 2.5 \log_{10}$). However, a mean difference of 1.8 \log_{10} on the viral load was found between assays, where the highest viral loads were detected by SYBR green real-time PCR. In the work outlined herein, another purpose was to generate vaccine candidates based on PCV2 capsid protein (Cap). Therefore, in the third study, three types of recombinant baculoviruses were constructed to express the Cap protein. In two recombinants, the nucleotide sequence from the signal peptide (SP) of bovine herpesvirus glycoprotein I (BoHV-gI) was inserted at the 5' end of the *cap* gene (ORF2). Additionally, one recombinant containing the SP nucleotide sequence was constructed lacking the nuclear localization signal (NLS) of Cap protein. Through immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), the PCV2 antigen was detected in Sf21 cells infected by the three recombinant viruses. This result suggests that the recombinants here constructed are potential vaccine candidates, once they were able to produce PCV2 antigens.

Keywords: PCV2, vaccine, PMWS, MPRCA, real-time PCR, competitive PCR, baculovirus

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Estrutura do capsídeo do PCV.....	19
FIGURA 2 - Cladograma dos gêneros e espécies incluídas na família <i>Circoviridae</i> ..	20
FIGURA 3 - Representação esquemática do genoma circular do PCV2	21
FIGURA 4 - Mapa mundial político mostrando a distribuição geográfica da SMDS..	28

Artigo I: *Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation*

FIGURA 1 - Detection of PCV2 DNA by MPRCA followed by digestion with <i>EcoRI</i>	50
FIGURA 2 - Phylogenetic relationships between PCV2 genotypes based on nucleotide sequences.....	50
FIGURA 3 - Immunoperoxidase monolayer assay using anti-PCV2-Cap polyclonal serum as primary antibody.....	51

Artigo II: *Comparative evaluation of a competitive PCR and a SYBR green based real-time PCR to quantify porcine circovirus type 2 DNA in swine tissue samples*

FIGURA 1 - Positions of the primers used in this study in relation to nucleotide sequence of PCV2 15/5P isolate genome.....	71
FIGURA 2 - Electrophoretic analysis of the products of the competitive PCR on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.....	72
FIGURA 3 - A. Standard curve constructed based on the amount of PCV2 DNA copies versus the threshold cycle (Ct) obtained on SYBR green real-time PCR. B. Dissociation curves of the SYBR green real-time PCR products of 10 PMWS positive samples.....	73
FIGURA 4 - Mean values and standard deviations of the number of PCV2 DNA molecules detected by cPCR (A) and the SYBR green real-time PCR (B) in five different tissues from either PMWS pigs (n=23) or non-PMWS pigs (n=9).....	74
FIGURA 5 - Bland-Altman plot of the differences between PCV2 DNA loads detected by SYBR green real-time PCR and competitive PCR	75

Artigo III: *Development of recombinant baculoviruses expressing PCV2 capsid protein*

FIGURE 1 - Strategy for amplification of recombinant DNA fragments.....	92
FIGURE 2 - Signal peptide prediction by SignalP 3.0 Neural Networks (Signal IP-NN) using the deduced amino acid sequences of BoHV gI (A) and PCV2 Cap protein (B).....	93
FIGURE 3 - Agarose gel electrophoresis of the recombinant DNA fragments generated on PCR.....	94
FIGURE 4 - Amino acid sequence alignment using the sequences from the cloned recombinant DNA fragments, PCV2 Cap protein (DQ923523) and the BoHV-gI signal peptide (AJ004801).....	95
FIGURE 5 - Immunoperoxidase monolayer assay with anti-PCV2-Cap polyclonal serum as primary antibody.....	96

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - Nomenclaturas publicadas referentes aos dois principais genogrupos de PCV2..... 24

TABELA 2 - Vacinas comerciais utilizadas no controle da Circovirose suína..... 42

Artigo I: *Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation*

TABELA 1 - Oligonucleotides used for sequencing of PCV2 genomes from cloned DNA (in plasmid pCR2.1)..... 49

TABELA 2 - PCR or MPRCA/REA detection of PCV2 DNA performed on tissues of animals with clinical signs of PMWS 50

Artigo II: *Comparative evaluation of a competitive PCR and a SYBR green based real-time PCR to quantify porcine circovirus type 2 DNA in swine tissue samples*

TABELA 1 - Prevalence and viral loads of PCV2 DNA detected on swine tissue samples using SYBR green real-time PCR or competitive PCR (cPCR).. 70

Artigo III: *Development of recombinant baculoviruses expressing PCV2 capsid protein*

TABELA 1 - Primers used for amplification of recombinant DNA fragments rf-Cap, rf-SP-Cap and rf-SP- Δ NLS-Cap. 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
ACR	Amplificação por círculo rolante
BEVS	<i>Baculovirus expression vector systems</i>
BoHV-gI	Glicoproteína I do herpesvírus bovino
bp	<i>Base pair</i>
Cap	Proteína do capsídeo do PCV2
CAV	Vírus da anemia infecciosa das galinhas
CDRS	Complexo das doenças respiratórias dos suínos
cPCR	PCR competitivo
CpG	citossina-fosforotiato-guanina não metilada
DICC ₅₀	doses infectantes para 50% do cultivo celular
ELISA	Ensaio imunoabsorção por ligação enzimática
E-MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
G-CSF	Fator estimulatório de colônias de granulócito
GFP	Proteína verde fluorescente
hpi	Horas pós-inoculação
hpt	Horas pós-transfecção
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IPMA	Ensaio de imunoperoxidase em monocamada
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
MIP-1	Proteína macrofágica inflamatória 1
mL	Mililitro
MPRCA	<i>Multiply-primed rolling-circle amplification</i>
ng	Nanograma
NIPC	Células naturalmente produtoras de interferon
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
ORF	<i>Fase aberta de leitura</i>

ORI	Origem de replicação
pb	Pares de base
PCAD	Porcine circovirus disease
PCAVD	Porcine circovirus-associated disease
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PCV2a	Circovírus suíno tipo 2 genótipo "a"
PCV2b	Circovírus suíno tipo 2 genótipo "b"
PCV2c	Circovírus suíno tipo 2 genótipo "c"
PDNS	<i>Porcine dermatitis and nephropathy syndrome</i>
PMWS	<i>Postweaning multisystemic wasting syndrome</i>
PPV	Parvovírus suíno
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
PRV	Vírus da doença de Aujeszky
PS	Peptídeo sinal
qPCR	PCR quantitativo
RCA	Amplificação por círculo rolante
REA	Análise de restrição enzimática
Rep	Proteína associada à replicação do PCV2
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SDNS	Síndrome da Dermatite e Nefropatia dos Suínos
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SLN	Sinal de localização nuclear
SMDS	Síndrome multissistêmica do definhamento do leitão
SP	<i>Signal peptide</i>
ssDNA	DNA de fita simples
TCS	Tremor congênito suíno
TLR	Toll-like receptor
TNF	Fator de necrose tumoral

VLP Partícula semelhantes a vírus
VSV-G Glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1. HISTÓRICO.....	18
1.2. CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2.....	19
1.2.1. TAXONOMIA	20
1.2.2. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO PCV2.....	20
1.2.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	23
1.2.4. CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	25
1.2.5. MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DO PCV2 EM CULTIVOS CELULARES	26
1.3. CIRCOVIROSE	26
1.3.1 SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DOS SUÍNOS.....	26
1.3.1.1. EPIDEMIOLOGIA	27
1.3.1.2. PATOGENIA	30
1.3.1.3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	31
1.3.1.4. LESÕES MACRO E MICROSCÓPICAS.....	34
1.3.1.5. DIAGNÓSTICO	34
1.3.1.6. MODELOS EXPERIMENTAIS DA SMDS	37
1.3.1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A SMDS	37
1.3.2. OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO PCV2.....	38
1.3.2.1. SÍNDROME DA DERMATITE E NEFROPATIA DOS SUÍNOS	38
1.3.2.2. COMPLEXO DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS.....	39
1.3.2.3. FALHAS REPRODUTIVAS.....	39
1.3.2.4. TREMOR CONGÊNITO	39
1.3.3. CONTROLE E PREVENÇÃO DA CIRCOVIROSE	40
1.3.3.1. BOAS PRÁTICAS DE MANEJO.....	40
1.3.3.2. SOROTERAPIA	40
1.3.3.3. VACINAÇÃO.....	41

2. OBJETIVOS	46
2.1. GERAIS:	46
2.2. ESPECÍFICOS:	46
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	47
ARTIGO I: MULTIPLY-PRIMED ROLLING-CIRCLE AMPLIFICATION (MPRCA) OF PCV2 GENOMES: APPLICATIONS ON DETECTION, SEQUENCING AND VIRUS ISOLATION	47
ARTIGO II: COMPARATIVE EVALUATION OF A COMPETITIVE PCR AND A SYBR GREEN BASED REAL-TIME PCR TO QUANTIFY PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 DNA IN SWINE TISSUE SAMPLES.....	53
ARTIGO III: DEVELOPMENT OF RECOMBINANT BACULOVIRUSES EXPRESSING PCV2 CAPSID PROTEIN ...	76
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	101

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. HISTÓRICO

Em 1974, um vírus semelhante ao picornavírus, não-citopático e contaminante da linhagem celular de rim de suíno foi descrito (TISCHER et al., 1974). Tal agente era um vírus pequeno (17 nm), icosaédrico, não-envelopado, contendo uma fita simples de DNA circular (ssDNA), o qual foi denominado circovírus suíno (*porcine circovirus*, PCV); (TISCHER et al., 1982). Estudos sorológicos mostraram que anticorpos contra o PCV estavam presentes em elevadas percentagens em suínos na Alemanha (TISCHER et al., 1986), Canadá (DULAC e AFSHAR, 1989), Grã-Bretanha (EDWARDS e SANDS, 1994) e Irlanda do Norte (ALLAN et al., 1994a), evidenciando a distribuição cosmopolita desse agente. Como o PCV não foi capaz de causar enfermidade em suínos infectados experimentalmente, o vírus foi considerado não-patogênico (ALLAN et al., 1995).

Nos anos 90, uma nova síndrome foi descrita no Canadá, por Dr. Edward Clark e Dr. John Harding (HARDING, 1996, CLARK, 1997). Os suínos afetados apresentavam definhamento, dificuldade respiratória, palidez da pele e icterícia, onde a mortalidade do rebanho era cerca de 12-15%. As lesões macroscópicas consistiam de linfadenopatia associada à pneumonia intersticial, hepatite, nefromegalia, esplenomegalia, úlceras gástricas e edema da parede intestinal. Depleção linfoide e infiltração granulomatosa em tecidos linfoides foram as principais lesões microscópicas observadas (HARDING e CLARK, 1997). Devido ao comprometimento de vários órgãos e a idade dos animais acometidos a doença foi denominada de *postweaning multisystemic wasting syndrome* – PMWS (HARDING, 1996, CLARK, 1997, HARDING e CLARK, 1997). No Brasil, o termo “síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos” (SMDS) tem sido utilizado em referência à PMWS (CIACCI-ZANELLA et al., 2006, ASANOME et al., 2008, CORRÊA et al., 2008). Análises filogenéticas e sorológicas demonstraram que tal vírus era genética e antigenicamente distinto do PCV descrito anteriormente, justificando a proposição de um novo tipo (MEEHAN et al., 1998, MOROZOV et al., 1998). Em função disso, o PCV descrito originalmente como contaminante de cultivos celulares passou a ser denominado PCV tipo 1 (PCV1), enquanto o PCV associado à SMDS foi denominado PCV tipo 2, ou PCV2 (MEEHAN et al., 1998, ALLAN et al., 1999b).

A SMDS é considerada uma doença emergente que atinge severamente a população mundial de suínos desde a década de 90 (SEGALÉS et al., 2005a). Entretanto, estudos sorológicos e moleculares mostraram que o PCV2 se encontrava presente em suínos pelo menos durante os últimos 40 anos (ALLAN e ELLIS, 2000, WALKER et al., 2000, GRIERSON et al., 2004). No Brasil, a SMDS foi descrita pela primeira vez em 2001 (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2001). Em 2002, a enfermidade foi relatada na região Sudeste do País (FRANÇA et al., 2005) e, no Rio Grande do Sul, foi descrita pela primeira vez em 2003 (PESCADOR et al., 2003). Entretanto, há evidências que o agente encontrava-se circulando na população suína do Brasil já na década de 80 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006).

1.2. CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2

O PCV é um vírus de genoma de DNA circular fita simples, não envelopado, de simetria icosaédrica que mede aproximadamente 17 nm (TISCHER et al., 1982), como representado na Figura 1. A densidade das partículas virais é de 1,36-1,37 g/mL em gradiente de cloreto de céσιο, o vírus não possui atividade hemaglutinante e é resistente ao clorofórmio, temperaturas altas e pH igual ou maior que 3 (ALLAN et al., 1994b).

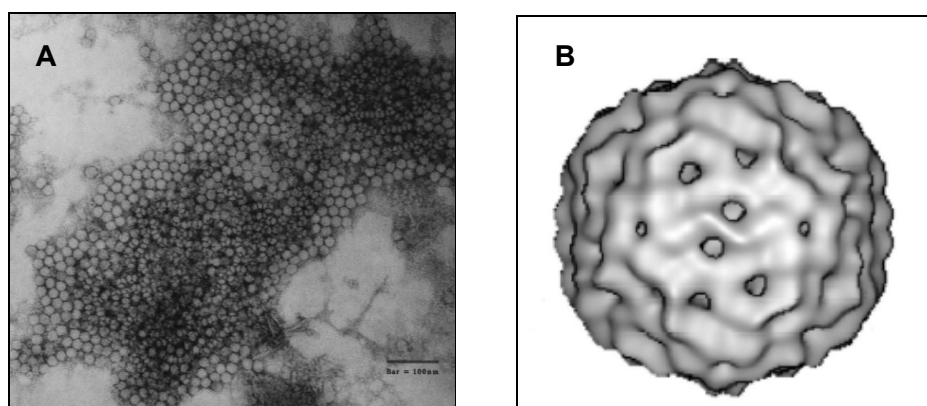


FIGURA 1 - Estrutura do capsídeo do PCV. (A) Microscopia eletrônica, aumento de 250.000 vezes. A barra indica 100 nm. Adaptado de (MCNULTY, 2006). (B) Mapa tridimensional do PCV2. Adaptado de (CROWTHER et al., 2003).

1.2.1. Taxonomia

O PCV2 é classificado no gênero *Circovirus* da família *Circoviridae* (PRINGLE, 1999). A classificação dos vírus dentro da família *Circoviridae* sofreu muitas modificações desde a sua criação e, possivelmente, sofrerá novas alterações, uma vez que circovírus recém descritos vem sendo continuamente relatados (TODD, 2004, DAVIDSON e SILVA, 2008). Atualmente, com base no tamanho do vírion e na organização genômica, a família *Circoviridae* é dividida em dois gêneros: *Circovirus* e *Gyrovirus* (Figura 2). O gênero *Circovirus* contém 10 espécies diferentes, as quais infectam várias espécies de aves e suínos. Apesar de ter sido sugerida a existência de um circovírus em bovinos (NAYAR et al., 1999), estudos posteriores não confirmaram este achado (ALLAN et al., 2000b, ELLIS et al., 2001). O vírus da anemia galinhas (CAV) é a única espécie representante do gênero *Gyrovirus*.

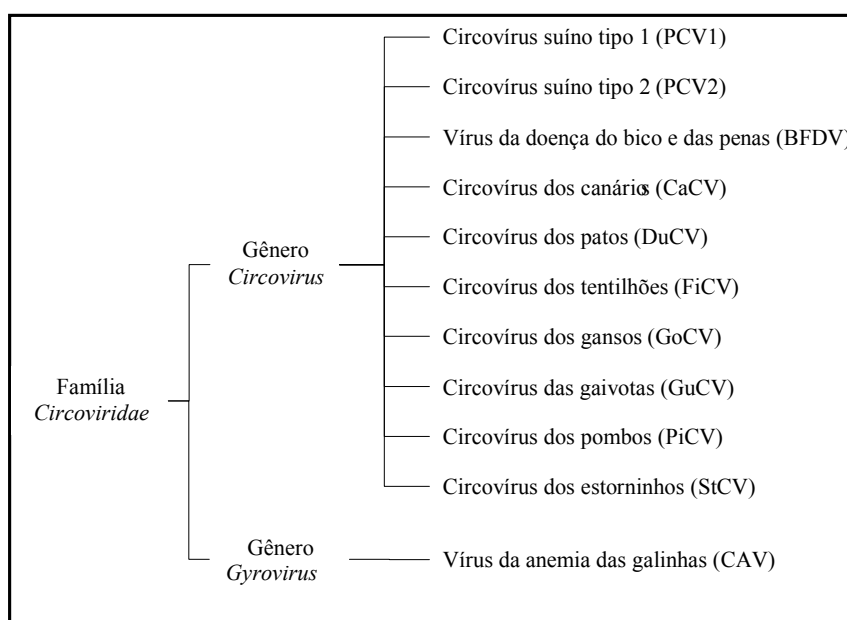


FIGURA 2 – Cladograma dos gêneros e espécies incluídas na família *Circoviridae*. Esquema elaborado com base em informações do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV).

1.2.2. Organização genômica do PCV2

O PCV2 tem um genoma de 1767 a 1768 nucleotídeos (MEEHAN et al., 1998) e dois genes principais, denominados *rep* e *cap*. O *rep* tem uma fase de leitura aberta

(ORF1), que se estende do nucleotídeo 51 ao 995 e está localizado na fita viral positiva (Figura 3). O *cap* localizado na ORF2 da fita viral negativa, se estende do nucleotídeo 1735 ao 1034. Na região intergênica está a origem de replicação do DNA (ORI), onde duas proteínas Rep ligam-se a uma estrutura palindrômica e iniciam o processo de replicação do tipo “círculo rolante” (MANKERTZ et al., 2004). A proteína Cap tem função estrutural (NAWAGITGUL et al., 2000). Outra proteína viral, esta associada à indução da apoptose, localizada na ORF3 da fita viral negativa se estende no nucleotídeo 671 ao 375 (LIU et al., 2005).

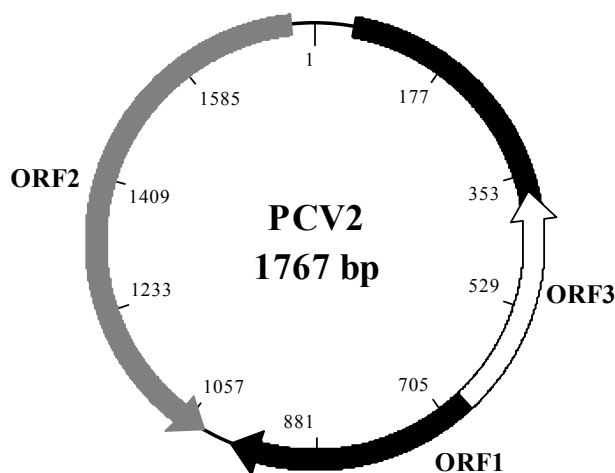


FIGURA 3 - Representação esquemática do genoma circular do PCV2. A ORF3 (em branco) está sobreposta à ORF1 (em preto). A ORF2 (em cinza) e ORF3 são transcritas a partir da fita viral negativa, enquanto que a ORF1 da fita viral positiva. Adaptado com base em informações de Nawagitgul et al. (2000) e Liu et al. (2005).

1.2.1.1. Proteínas do *rep*

O gene *rep* codifica duas proteínas essenciais para a replicação, a Rep e a Rep' (CHEUNG, 2003a). A proteína Rep possui 312 aminoácidos, sendo a tradução completa da ORF1, enquanto que a Rep' possui 168 aminoácidos e é o produto da clivagem do mRNA transcrito da ORF1 (MANKERTZ e HILLENBRAND, 2001). Experimentos

mostraram que a Rep reconhece o “braço” direito do palíndromo, enquanto que a Rep’ reconhece os seis nucleotídeos proximais da sequência repetida na origem de replicação (STEINFELDT et al., 2001) e somente se ambas forem expressas simultaneamente a replicação do DNA viral ocorre (MANKERTZ e HILLENBRAND, 2001).

Em células infectadas, os dois transcritos, Rep e Rep’ aparecem em quantidades similares 12 horas após transfecção (hpt). Em 24 e 36 hpt a Rep’ é predominante e o número de transcritos desta diminui a partir de 48-96 hpt. A regulação da transcrição do gene *rep* é realizada por um promotor localizado imediatamente ao início do gene e este promotor é negativamente regulado pela proteína Rep (MANKERTZ e HILLENBRAND, 2001).

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

1.2.1.2. Proteína do *cap*

A ORF2 do PCV2 foi clonada e expressa em células de insetos. A proteína sintetizada apresentou massa molecular de 30 kDa, similar à detectada em partículas virais purificadas. Quando visualizada por microscopia eletrônica a proteína recombinante originada da ORF2 foi capaz de se auto-encapsidar, formando partículas semelhantes a capsídeos, indicando que ORF2 codifica a proteína estrutural do capsídeo, a Cap (NAWAGITGUL et al., 2000). Animais inoculados com proteínas recombinantes expressas por baculovírus ou vacinas de DNA contendo a ORF2 produziram anticorpos contra PCV2, demonstrando que a proteína expressa é imunogênica (BLANCHARD et al., 2003, FENAUX et al., 2003). Testes de imunofluorescência e ELISA para pesquisa de anticorpos, utilizando como antígeno total o PCV2 ou a proteína Cap recombinante, produziram resultados similares, o que evidencia que a maioria da resposta imune humoral foi direcionada contra a proteína codificada pela ORF2, sugerindo que a mesma seja imunodominante (NAWAGITGUL et al., 2000). Aparentemente, os epitópos imunodominantes estão localizados nos resíduos de aminoácidos 47 a 84, 165 a 200 e nos últimos quatro aminoácidos da extremidade C-terminal da proteína (LEKCHAROENSUK et al., 2004).

1.2.1.2.1. Sinal de localização nuclear da ORF2

Algumas proteínas possuem sequências de aminoácidos (aa) que as direcionam para o núcleo, estas sequências são denominadas de sinais de localização nuclear (SLNs). Apesar de não existir uma norma rígida quanto à determinação de SLNs, sabe-se que sequências de aminoácidos básicos são os principais componentes destes (SILVER, 1991).

Na proteína Cap do PCV2, foram identificadas duas regiões de aa básicos localizadas nos 41 aa da região N-terminal. Esta região, quando deletada, levou ao acúmulo da proteína no citoplasma (LIU et al., 2001). Neste mesmo experimento, a sequência de nucleotídeos da ORF2 codificante para os 41 aa da região N-terminal foram inseridos à montante ao gene da proteína verde fluorescente (GFP), resultando no direcionamento da GFP para o núcleo.

1.2.1.3. Proteína codificada pela ORF3

A proteína codificada pela ORF3 é expressa predominantemente no núcleo e com menor frequência no citoplasma de células. Esta proteína não é necessária para a replicação viral; entretanto, está envolvida no processo de indução da apoptose (LIU et al., 2005). É possível que a apoptose induzida pela ORF3 possa desempenhar um importante papel na patogenia viral, uma vez que um vírus mutante incapaz de sintetizar a proteína codificada pela ORF3 não induziu lesões em camundongos, mas foi capaz de se replicar eficientemente (LIU et al., 2006b). Em suínos, foi demonstrado que animais inoculados com vírus mutantes sem ORF3 tem menores níveis de viremia e soroconversão retardada em comparação com animais inoculados com vírus selvagem (KARUPPANNAN et al., 2009, JUHAN et al., 2010). Entretanto, a ORF3 por si só não parece ser o único fator responsável pela patogenicidade do PCV2, uma vez que a expressão da ORF3 do PCV1 em cultivo celular induziu níveis maiores de apoptose em relação a ORF3 do PCV2 (CHAIYAKUL et al., 2010).

1.2.3. Caracterização genética

O PCV1 possui um genoma com 1759 pb, enquanto que o PCV2 possui 18 a 19 nucleotídeos adicionais (MEEHAN et al., 1998). A identidade entre sequências

genômicas de PCV1 e PCV2 varia de 68 a 76% (HAMEL et al., 1998, MEEHAN et al., 1998), sendo uma origem comum sugerida para ambos vírus (OLVERA et al., 2007).

As primeiras análises filogenéticas mostraram que PCV2 isolados de diferentes origens geográficas variaram em sua sequência genômica (HAMEL et al., 1998, FENAUX et al., 2000, MEEHAN et al., 2001). Posteriormente, com base na sequência de aminoácidos e de nucleotídeos do genoma do PCV2, dois genogrupos de PCV2 foram identificados (DE BOISSESON et al., 2004, TIMMUSK et al., 2005, CARMAN et al., 2006, GAGNON et al., 2007, OLVERA et al., 2007, GRAU-ROMA et al., 2008), tendo sido propostas diferentes nomenclaturas para os mesmos (Tabela 1).

TABELA 1 – Nomenclaturas publicadas referentes aos dois principais genogrupos de PCV2.

Referência	Classificação dos Genogrupos	
	I	II
DE BOISSESON et al., 2004	I	II
TIMMUSK et al., 2005	SG3	SG1/SG2
CARMAN et al., 2006	Padrão 321-semelhante	Padrão 422-semelhante
OLVERA et al., 2007	Grupo1	Grupo 2
GRAU-ROMA et al., 2008	Genótipo 1	Genótipo 2
GAGNON et al., 2007	PCV2b	PCV2a

Atualmente, a nomenclatura PCV2a e PCV2b tem sido adotada internacionalmente (SEGALÉS et al., 2008). Recentemente, um novo genótipo foi identificado em amostras dinamarquesas de tecidos arquivados (DUPONT et al., 2008) e denominado PCV2c (SEGALÉS et al., 2008). Na Dinamarca, constatou-se que PCV2c estava circulando predominantemente na década de 80, enquanto que o PCV2a durante os anos 90, e PCV2b de 2001 em diante, sugerindo uma potencial mudança na predominância de genótipos de PCV2 isolados ao longo do tempo (DUPONT et al., 2008). No mesmo estudo, a análise de sequências de PCV2, depositadas até fevereiro de 2007 no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), evidenciou que PCV2b tornou-se predominante em vários países ao longo do tempo, apontando para uma mudança global do genótipo PCV2a para PCV2b. Essa distribuição temporal de genótipos de PCV2 e do predomínio atual da PCV2b é suportado por vários estudos epidemiológicos em nível mundial (TIMMUSK et al., 2005, ALLAN et al., 2007, CHEUNG et al., 2007, GAGNON et al., 2007, TAKAHAGI et al., 2008, CHIARELLI-

NETO et al., 2009). No Brasil a presença destes dois genótipos de PCV2 já foi relatada (CHIARELLI-NETO et al., 2009, CIACCI-ZANELLA et al., 2009b).

A detecção de diferentes cepas de PCV2 em um mesmo animal também tem sido descrita (DE BOISSESON et al., 2004, CHEUNG et al., 2007, GAGNON et al., 2007, GRAU-ROMA et al., 2008, HESSE et al., 2008). Estudos recentes comprovam a recombinação homóloga entre as linhagens de PCV2 que estão co-infectando um mesmo animal (HESSE et al., 2008, CHEUNG, 2009) ou replicando simultaneamente em cultivo celular (LEFEBVRE et al., 2009). Estes autores sugerem que o aparecimento de novas cepas e uma possível mudança na prevalência do genótipo PCV2a para PCV2b, poderia ter sido o resultado de recombinação entre linhagens coexistindo em um mesmo animal. Existem divergências se gravidade da doença está relacionada a algum genótipo específico, uma vez que genótipos 2a e 2b tem sido recuperados em casos SMDS e em animais saudáveis (GRAU-ROMA e SEGALLES, 2007, HESSE et al., 2008, WIEDERKEHR et al., 2009).

1.2.4. Ciclo de replicação viral

O ciclo viral inicia com a adsorção do PCV2 à glicosaminoglicanos da célula (MISINZO et al., 2006), sendo que a internalização ocorre via endocitose mediada por clatrina (MISINZO et al., 2005). Após internalizado acredita-se que o genoma viral assumam formas replicativas intermediárias de fita dupla, sintetizadas a partir da fita molde do genoma do PCV2, como ocorre com os geminivírus (GUTIERREZ, 1999). Uma vez que o circovírus não sintetiza sua própria DNA polimerase para a produção de intermediários replicativos, ele depende de DNA polimerases do hospedeiro para completar seu ciclo de replicação (TISCHER et al., 1987).

A dinâmica do ciclo replicativo varia com o tipo de célula infectada. Em cardiomiócitos fetais e macrófagos alveolares suínos, antígenos virais no núcleo podem ser identificados após 48 horas em menor proporção do que em células PK-15 (MEERTS et al., 2005). Nestas últimas, a proteína do capsídeo é expressa entre 6-12 horas pós-inoculação (hpi) e é deslocada para o núcleo 12 a 24 hpi, quando a proteína Rep é detectada no núcleo antígenos virais são detectados no citoplasma e núcleo em torno de 18 hpi, sendo as partículas virais liberadas 32 hpi (CHEUNG e BOLIN, 2002). Este ciclo de replicação difere do observado em monócitos e macrófagos, nos quais a

proteína do capsídeo do PCV2 é detectada no citoplasma, mas nenhuma evidência de replicação é observada. Isto provavelmente ocorre porque estas células estão em estágio de diferenciação terminal, onde a maquinaria de replicação celular não é, na maioria das vezes, ativa (GILPIN et al., 2003).

1.2.5. Multiplicação *in vitro* do PCV2 em cultivos celulares

O PCV2 é um vírus de cultivo fastidioso que raramente excede o título 10^5 doses infectantes para 50% do cultivo celular ($DICC_{50}/ml$), mesmo com o uso de glucosamina, substância indutora do ciclo celular que aumenta em 50 vezes a produção de antígeno viral (TISCHER et al., 1987, GILPIN et al., 2003, MEERTS et al., 2005). O baixo nível de replicação do PCV2 foi atribuído à heterogeneidade das linhagens celulares que suportam sua replicação *in vitro* (ZHU et al., 2007). Neste estudo, células PK-15 foram clonadas através de diluição limitante e foram obtidos clones de baixa e alta permissividade ao PCV2. Em clones de alta permissividade, o vírus atingiu títulos de 10^8 $DICC_{50}/ml$, enquanto que na linhagem original e em clones de baixa permissividade os títulos não ultrapassaram 10^5 $DICC_{50}/ml$ e 10^2 $DICC_{50}/ml$, respectivamente.

1.3. CIRCOVIROSE

No Brasil o termo “Circovirose” vem sendo rotineiramente empregado para designar manifestações clínicas associadas ao PCV2 (MORÉS et al., 2007), enquanto que na Europa o termo *porcine circovirus disease* (PCVD)(SEGALÉS et al., 2005a) e nos EUA o termo *porcine circovirus-associated disease* (PCVAD) (OPRIESSNIG et al., 2007) têm sido utilizados. Dentre as manifestações clínicas relacionadas com a infecção por PCV2 pode-se citar a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), a Síndrome da Dermatite e Nefropatia dos Suínos (SDNS), problemas respiratórios, falhas reprodutivas e tremores congênito.

1.3.1 Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos

A SMDS é uma síndrome caracterizada pela perda de peso, aumento do volume dos linfonodos, dispneia, e menos frequentemente palidez, icterícia e diarreia; a qual

acomete principalmente leitões desmamados (HARDING e CLARK, 1997, ALLAN et al., 1999a, ALLAN e ELLIS, 2000, CHOI e CHAE, 2000). Atualmente, a SMDS é endêmica em muitos países, sendo a principal causa de refugagem em plantéis de suínos (CHAE, 2004).

A SMDS é uma doença viral que tem como principal agente etiológico o PCV2. Porém, sugere-se que para o completo desenvolvimento da síndrome, exista a necessidade de co-infecção com outros agentes infecciosos (ALLAN et al., 1999a, CHOI e CHAE, 2000, HARMS et al., 2001) ou co-fatores imunestimulatórios (KRAKOWKA et al., 2001, KYRIAKIS et al., 2002).

1.3.1.1. Epidemiologia

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

1.3.1.1.1. Distribuição geográfica

O vírus é amplamente disseminado na população suína, uma vez que estudos mostraram que a soroprevalência do PCV2 chega a 100% em animais em fase de terminação e em nenhuma granja todos animais do plantel foram soronegativos (LAROCHELLE et al., 2003). Em média, a percentagem de animais soropositivos nos rebanhos americanos é de 50% (NAWAGITGUL et al., 2002). Até o presente momento, a SMDS tem sido diagnosticada em países dos cinco continentes e na maioria dos países produtores de carne suína (Figura 4). É importante destacar a situação diferenciada da Austrália, onde a presença de PCV2 foi demonstrada, mas até o momento nenhum caso de SMDS foi dignósticoado neste país (RAYE et al., 2005, FINLAISON et al., 2007).

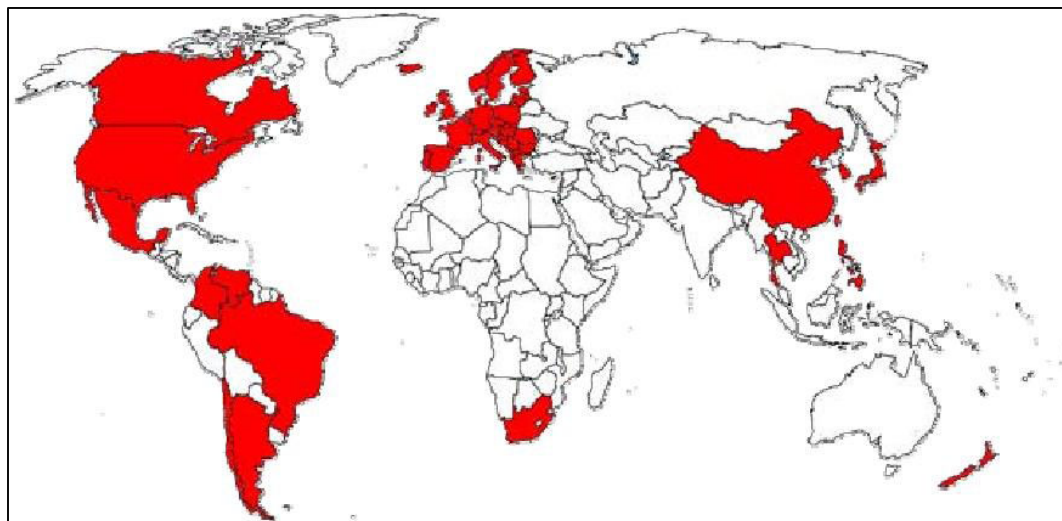


FIGURA 4 – Mapa mundial político mostrando a distribuição geográfica da SMDS. Os países onde a SMDS já foi relatada estão representados em vermelho. Adaptado de (GRAU-ROMA et al., 2010).

1.3.1.1.2. Espécies susceptíveis

Além do suíno doméstico, outra espécie susceptível ao PCV2 é o javali. Vários trabalhos indicaram que o PCV2 pode infectar e até mesmo causar doença em javalis (ELLIS et al., 2003, SCHULZE et al., 2003, VICENTE et al., 2004, LIPEJ et al., 2007). Em criações comerciais de javalis, 48% dos animais apresentaram títulos de anticorpos médios ou altos, ≥ 320 (VICENTE et al., 2004). Apesar do javali ter importância epidemiológica para o PCV2, seu papel ainda não é totalmente compreendido, sendo mais provável que o suíno doméstico seja o reservatório natural do vírus, que o javali propriamente (VICENTE et al., 2004).

Apesar de estudos iniciais sugerirem que a infecção por PCV possa ocorrer em espécies diferente das suínas, descrevendo infecções em humanos, bovinos e camundongos (TISCHER et al., 1995, NAYAR et al., 1999), ensaios sorológicos subsequentes em bovinos, caprinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, murinos e humanos não mostraram evidências de infecção (ALLAN et al., 2000a, ELLIS et al., 2000, ELLIS et al., 2001, RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2003). Por outro lado, dados controversos têm sido obtidos de infecções experimentais realizadas em espécies diferentes da suína. Enquanto um estudo não mostrou evidências da replicação do PCV2 em camundongos (QUINTANA et al., 2002), outros relataram que o PCV2 pode replicar e ser disseminado por camundongos (KIUPEL et al., 2001, LIU et al., 2006a,

CSÁGOLA et al., 2008). Ao mesmo tempo, infecções experimentais em ovelhas e coelhos por PCV2 não resultaram em soroconversão ou presença de lesões patológicas (ALLAN et al., 2000b, QUINTANA et al., 2002). Até o presente momento, a ideia mais aceita é que a maioria das espécies “não-suínas”, não são susceptíveis à infecção por PCV2 e não participam na epidemiologia do vírus, sendo o camundongo possivelmente a única exceção.

1.3.1.1.3. Vias de transmissão

Existem evidências que a transmissão do PCV2 pode ocorrer tanto horizontalmente quanto verticalmente, sendo a transmissão horizontal, via oro-nasal, considerada a rota mais provável e frequente para a transmissão do PCV2 (TOMÁS et al., 2008). A transmissão horizontal da SMDS tem sido demonstrada experimentalmente. Após a mistura de animais saudáveis com animais acometidos pela síndrome, os saudáveis desenvolveram sinais clínicos da doença em 1-2 semanas após a introdução dos doentes (KRISTENSEN et al., 2006).

O vírus tem sido detectado em vários tipos de secreções/excreções, tais como nasais, bronco-traqueais, orofaríngeas, fecais e urinárias, tanto de suínos clinicamente acometidos pela síndrome (SEGALÉS et al., 2005b, SHIBATA et al., 2006), como de animais clinicamente sadios (SEGALÉS et al., 2005b). O colostro e o sêmen também têm sido apontados como potenciais fontes de infecção (HAMEL et al., 2000, LAROCHELLE et al., 2000, SHIBATA et al., 2006).

A transmissão do PCV2 também pode ocorrer verticalmente (SEGALÉS et al., 2005a). O isolamento de PCV2 de fetos abortados sugere a possibilidade de transmissão vertical (MEEHAN et al., 2001). A detecção de PCV2 no sêmen de reprodutores infectados naturalmente (KIM et al., 2001) e experimentalmente (LAROCHELLE et al., 2000) indica que pode ocorrer a transmissão viral de reprodutores para as fêmeas e suas respectivas proles. A transmissão transplacentária tem sido demonstrada após infecções intranasais realizadas três semanas antes do parto (PARK et al., 2005, HA et al., 2008). Um destes estudos relatou aborto e parto prematuro nas porcas inoculadas com PCV2 (PARK et al., 2005), enquanto outro observou partos normais (HA et al., 2008). É interessante notar que a frequência com que o PCV2 é associado às desordens reprodutivas ainda permanece controversa. Contudo, alguns autores às descrevem como raras (LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001, MALDONADO et al., 2005), outros as

relatam como eventos frequentes, com infecções por PCV2 que chegam a até 13% em fetos abortados e recém-nascidos (KIM et al., 2004).

1.3.1.2. Patogenia

A maioria dos animais infectados não apresenta doença clínica, porém a infecção pode ser evidenciada pela soroconversão (QUINTANA et al., 2001). Acredita-se que a imunossupressão, caracterizada pela depleção linfóide e linfopenia, seja o evento determinante do desencadeamento da síndrome (SEGALES et al., 2004, OPRIESSNIG et al., 2007). Alguns autores sugerem que, para o completo desenvolvimento da síndrome, existiria a necessidade de co-infecções virais, como o parvovírus suíno e o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (ALLAN et al., 1999a, CHOI e CHAE, 2000, HARMS et al., 2001) ou co-fatores imunostimulatórios (KRAKOWKA et al., 2001, KYRIAKIS et al., 2002).

Outros fatores que tem sido associados à ocorrência da SMDS são a presença de infecções bacterianas, causadas por agentes como o *Mycoplasma hyopneumoniae* (OPRIESSNIG et al., 2004) e a *Pasteurella multocida* (THOMSON et al., 2000, LAINSON et al., 2002). Evidências sugerem que bactérias que contém lipopolisacarídeos, como as Gram-negativas, poderiam estimular a replicação viral e contribuir no desenvolvimento da SMDS (CHANG et al., 2006).

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

Devido ao fato do vírus ser frequentemente detectado em células epiteliais (ROSELL et al., 2000a), foi sugerido que este tipo de célula possa ser o tipo celular primário mais permissível à replicação do PCV2 (DARWICH et al., 2004). Após a infecção e replicação primária nas células primárias, acredita-se que o PCV2 seja transportado para os principais alvos (linfonodos e/ou corrente sanguínea), contribuindo para a disseminação do vírus (ROSELL et al., 1999). No estágio posterior da doença, o vírus está presente em órgãos como intestino, rins e fígado, podendo causar alterações que colaboram para ocorrência da SMDS (SEGALES et al., 2004).

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

1.3.1.3. Aspectos imunológicos

Animais com SMDS apresentam monocitose, neutrofilia, linfopenia e diminuição de células CD8⁺, CD4⁺ e IgM⁺ (DARWICH et al., 2002). A linfopenia induzida por PCV2 em animais sintomáticos levou à hipótese que eventos imunossupressores seguidos de infecção por PCV2 teriam um importante papel no desenvolvimento de doenças associadas ao vírus (NIELSEN et al., 2003). Sabe-se também que o vírus se associa a células da linhagem monocítica *in vivo* (ROSELL et al., 1999, KRAKOWKA et al., 2002) e *in vitro*, sem mostrar qualquer sinal de replicação (GILPIN et al., 2003, VINCENT et al., 2003). A habilidade do vírus de se replicar e persistir por um longo tempo no organismo indica uma falha na resposta imunológica do hospedeiro em reconhecer ou remover as partículas virais e as células infectadas (MEERTS et al., 2006).

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

1.3.1.3.1. Perfil de expressão de citocinas *in vivo* e *in vitro*

O genoma do PCV2 possui sequências que podem ter efeito imunomodulador. Baseado em critérios previamente descritos (KRIEG, 2002), o genoma do PCV2 apresenta uma proporção de 60% e 40% de motivos CpG (citosina-fosforotriato-guanina não metilada) imunoestimulatórios e imunoinibitórios, respectivamente. Cinco

sequências baseadas no genoma do PCV2 foram testadas e se verificou que uma delas apresentava efeito inibitório na produção de Interferon- α (IFN- α) pelas células monocíticas do sangue periférico (HASSLUNG et al., 2003).

Células naturalmente produtoras de interferon (NIPC) reconhecem motivos CpG via *Toll-like receptor 9* (TLR9) e, a partir daí, produzem uma resposta imune (HEMMI et al., 2000). O PCV2 tem a capacidade de bloquear a produção de IFN- α e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) induzida por CpG em NIPC (VINCENT et al., 2005). Como as NIPC são as principais fontes dessas citocinas, a resposta imune inata dependente de IFN- α e TNF- α , assim como ativação da resposta celular T e B específicas, tornam-se ineficazes (FITZGERALD-BOCARSLY, 2002).

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

Suínos com SMDS têm padrões alterados de mRNA que expressam citocinas. Ocorre um aumento do mRNA que expressa a IL-10 no timo e IFN- γ nas tonsilas. O aumento de IL-10 tem sido associado à depleção e atrofia tímica em animais doentes. A diminuição da expressão de mRNA foi observada para IL-2 no baço, IL-4 nas tonsilas e linfonodos, IL-12p40 em linfonodos inguinais e esplênicos e IFN- γ e IL-10 em linfonodos inguinais. Estes achados, associados ao fato da redução de células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue e depleção e atrofia tímica, são indicativos de uma imunossupressão de células T, o que prejudicaria o sistema imune de suínos afetados pela síndrome (DARWICH et al., 2003b).

Células mononucleares do sangue periférico derivadas de animais com SMDS não produziram níveis normais de IFN- γ ou IL-1 β , IL-2, IL-4 ou IL-8 quando desafiadas com fitohemaglutinina ou superantígenos, mas produziram IFN- γ ou IL-10

quando desafiadas com antígenos de PCV2, evidenciando que animais com SMDS tem uma redução na habilidade de realizar suas funções imunológicas normais quando expostos a vírus ou moléculas imunoestimulatórias (DARWICH et al., 2003a).

1.3.1.3.2. Resposta mediada por anticorpos frente ao PCV2

Os níveis de anticorpos contra PCV2 adquiridos via colostro diminuem gradualmente da 3^a até a 10^a semana de vida do leitão, onde atingem o limite mínimo (LAROCHELLE et al., 2003). A proteção conferida por anticorpos maternos contra PCV2, parece ser título dependente. Títulos altos de anticorpos, obtidos no teste de ELISA, são geralmente protetores enquanto que títulos baixos não (MCKEOWN et al., 2005).

Animais inoculados experimentalmente soroconvertem 14 a 28 dpi (KRAKOWKA et al., 2001, NAWAGITGUL et al., 2002) e os níveis de anticorpos aumentam gradualmente até pelo menos o 49^o dia (NAWAGITGUL et al., 2002). Suínos expostos ao PCV2 sob condições de campo soroconvertem entre 7 e 12 semanas de vida e o título se mantém elevado pelo menos até a 28^o semana de vida, porém uma porcentagem dos animais se mantém virêmico (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2002).

Animais SPF inoculados com PCV2, aumentaram gradativamente os níveis de IgM até o final do experimento (21^o dpi), enquanto que nos animais afetados pela síndrome os títulos de IgM começaram a cair a partir do 10^o dpi e foram significativamente inferiores no 21^o dpi em relação ao grupo não inoculado. Os níveis de IgG1, IgG2 e IgA foram levemente menores nos animais acometidos pela síndrome. Neste mesmo estudo, observou-se que a ausência de anticorpos neutralizantes está relacionada com altas taxas de replicação viral e com a manifestação clínica da síndrome (MEERTS et al., 2006).

A resposta mediada por anticorpos frente a PCV1 e PCV2 é tipo-específica, para a proteína do capsídeo. Em um estudo, onde foram expressas a proteína Rep do PCV1 e PCV2 através de baculovírus ou plasmídeos, verificou-se que anticorpos policlonais anti-PCV2 apresentaram reatividade cruzada para Rep (MAHE et al., 2000). O mesmo não ocorreu quando foi expressa a proteína do capsídeo, que induziu uma resposta tipo-específica. Resultados similares foram obtidos quando foi utilizado soro hiperimune de coelho contra PCV2 para imunofluorescência indireta, onde verificou-se que os mesmos

reagiram fortemente contra PCV2, mas não reagiram contra PCV1 (ALLAN et al., 1999b).

1.3.1.4. Lesões macro e microscópicas

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

Em animais com a síndrome, as lesões microscópicas observadas são: depleção linfoide e infiltração histiocística. Estas lesões, nos gravemente acometidos, são observadas em praticamente todos os tecidos, incluindo os linfonodos, tonsilas, placas de Peyer, baço e timo (ROSELL et al., 1999). Outras lesões observadas são a inflamação granulomatosa e presença de corpúsculos de inclusões intracitoplasmáticas. A inflamação granulomatosa é observada nos linfonodos, fígado, baço, timo, placas de Peyer e linfonodos inguinais superficiais, consistindo de um infiltrado de células epitelioides e células gigantes multinucleadas (CHAE, 2004).

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

1.3.1.5. Diagnóstico

O PCV2 pode ser detectado em animais sadios, portanto a simples detecção da presença viral não é confirmatória para a síndrome. Para diagnóstico de SMDS deve ser observada a presença de PCV2 nas lesões, sinais clínicos compatíveis e lesões

microscópicas características. Duas formas de diagnóstico da síndrome têm sido descritas, individual e de rebanho, as quais serão descritas a seguir.

1.3.1.5.1. Diagnóstico individual

Embora o definhamento e as alterações respiratórias observadas na fase de maternidade e creche contribuam para o diagnóstico da SMDS, os sinais clínicos e as lesões desta doença são inespecíficos e, portanto, não são suficientes para diagnosticar a doença. Além disso, o fato do PCV2 ser cosmopolita na população suína dificulta o diagnóstico da síndrome. Atualmente, existem três critérios utilizados para diagnosticar a SMDS (SORDEN, 2000, SEGALÉS et al., 2005a):

- 1) Presença de sinais clínicos compatíveis, incluindo o definhamento ou retardo no crescimento.
- 2) Presença de lesões histopatológicas moderadas a graves, incluindo depleção linfocitária e infiltrado histiocitário.
- 3) A detecção de quantidades moderadas a altas de PCV2 nas lesões de tecidos linfoides e outros tecidos de suínos afetados.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para detectar PCV2 nos tecidos e correlacionar a sua detecção com a presença de lesões. Entre eles, a hibridização *in situ* e a imunohistoquímica são os testes mais utilizados rotineiramente (MCNEILLY et al., 1999, ROSELL et al., 1999). Esses métodos mostraram uma forte correlação entre a quantidade de ácido nucléico ou do antígeno de PCV2 e da gravidade de lesão microscópicas do tecido linfoide (ROSELL et al., 1999, QUINTANA et al., 2001). Consequentemente, devido ao fato do diagnóstico de SMDS exigir a detecção de quantidades moderadas a altas de PCV2 nos tecidos linfoides, isso acarreta na presença de lesões microscópicas moderadas a graves, nos tecidos dos suínos afetados. Os suínos que estão na primeira semana da infecção clínica são os que mais facilmente preenchem os critérios de diagnóstico (SEGALÉS et al., 2004), enquanto que suínos convalescentes ou recentemente infectados podem apresentar lesões microscópicas leves e uma pequena quantidade de antígeno/ácido nucléico viral presente nas lesões (QUINTANA et al., 2001).

1.3.1.5.2. Diagnóstico de rebanho

O estabelecimento do diagnóstico da SMDS em nível de rebanho ainda é controverso, pois sabe-se que granjas que apresentam bom desempenho podem apresentar animais com a síndrome (JORSAL et al., 2006). Por esta razão, cientistas do Consórcio europeu de investigação de doenças associadas ao PCV (www.pcvd.org/news.php) estabeleceram dois critérios para considerar um rebanho afetado por SMDS, os quais são:

1) Aumento significativo nas taxas de mortalidade pós-desmame e definhamento, em relação ao histórico do rebanho. O aumento da mortalidade é considerado significativo quando é igual ou maior que a média histórica acrescida 1,66 vezes seu desvio padrão. Se não há dados históricos disponíveis, o aumento da mortalidade deve exceder a média nacional ou regional em 50%.

2) Diagnóstico individual de SMDS em pelo menos um de cinco suínos necropsiados.

1.3.1.5.3. Métodos utilizados na detecção de antígenos, DNA viral e anticorpos contra PCV2

A imunohistoquímica e hibridização *in situ* são as técnicas mais comumente utilizadas para estabelecer um diagnóstico SMDS, produzindo resultados semelhantes (MCNEILLY et al., 1999, ROSELL et al., 1999). No entanto, outras técnicas para detectar o antígeno de PCV2 ou ácidos nucleicos e seus anticorpos são relatados na literatura. Entre eles, a PCR tem se mostrado um teste muito sensível (LAROCHELLE et al., 1999, HAMEL et al., 2000, KIM e CHAE, 2001, CALSAMIGLIA et al., 2002), sendo utilizada em várias espécimes tais como soro, excreções, secreções e tecidos (QUINTANA et al., 2001, SHIBATA et al., 2003). No entanto, a PCR não é capaz de diferenciar entre infecções clínicas e subclínicas (MCNEILLY et al., 2002). Levando em consideração que infecções subclínicas por PCV2 são frequentes e que a infecção por PCV2 nem sempre resulta em doença clínica, a PCR não-quantitativa não deve ser usada para diagnosticar SMDS (MCNEILLY et al., 2002, SEGALÉS et al., 2005a). Da mesma forma, um grande número de técnicas sorológicas relatadas na literatura, incluindo ensaio de imunoperoxidase em monocamada (IPMA) (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2000), imunofluorescência indireta (COTTRELL, 1999, ALLAN e

ELLIS, 2000) e ELISA (WALKER et al., 2000, TRUONG et al., 2001, WU et al., 2008) são úteis para monitorar a infecção pelo PCV2, porém não devem ser usados para fins de diagnóstico (RODRIGUEZ-ARRIOJA et al., 2000, SIBILA et al., 2004).

Técnicas como PCR quantitativo (qPCR), ELISA de captura de antígeno e análise imunocitoquímica de criocortes permitem a quantificação do vírus em tecidos (MCNEILLY et al., 2002). Levando em consideração que existe uma correlação entre a quantidade de ácido nucléico de PCV2 ou do antígeno viral com a gravidade das lesões microscópicas características de SMDS (ROSELL et al., 1999, QUINTANA et al., 2001), estas técnicas poderiam ser usadas para diagnosticar a SMD. Assim, alguns autores sugeriram valores-limite, 10^7 cópias do genoma viral por mL de sangue, para diagnosticar a SMDS nos animais vivos, usando técnicas de qPCR (BRUNBORG et al., 2004, OLVERA et al., 2004, SEGALÉS et al., 2005b).

1.3.1.6. Modelos experimentais da SMDS

Infecções experimentais de PCV2 em leitões gnotobióticos (ELLIS et al., 1999, KRAKOWKA et al., 2000, KRAKOWKA et al., 2001), privados da ingestão de colostro (ALLAN et al., 1999a, BOLIN et al., 2001) ou amamentados com colostro (BALASCH et al., 1999, MAGAR et al., 2000, LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002, RESENDES et al., 2004), tem sido utilizadas para o esclarecimento do papel do PCV2 na patogenia da síndrome. Inoculações experimentais com PCV2 tem produzido sinais clínicos de SMDS, todavia parece que a severidade da doença depende de uma série de fatores. Uma meta-análise realizada com o objetivo de identificar fatores relevantes sobre a manifestação clínica da SMDS em condições experimentais, identificou alguns destes fatores (TOMÁS et al., 2008). Dados de 44 estudos foram incluídos na análise, com base nos resultados da meta-análise, a experimentação animal com maior probabilidade de sucesso deve incluir: (1) leitões privados de colostro, (2) idade inferior a três semanas no momento da inoculação (3), altas doses de inóculo do PCV2 (4) cepas de PCV2b e (5) co-infecção com outros patógenos de suínos.

1.3.1.7. Considerações finais sobre a SMDS

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

- A doença aparece em suínos desmamados ou na fase inicial de terminação;

- Somente 10-30% dos suínos naturalmente infectados desenvolvem a SMDS;
- A característica mais proeminente da doença é depleção linfóide generalizada afetando órgãos linfóides primários e secundários, assim como a circulação de linfócitos.
- Infecções experimentais com PCV2 podem reproduzir a SMDS, porém quando ocorre a co-infecção com PRRSV e PPV a doença é mais grave.

1.3.2. OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO PCV2

1.3.2.1. Síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos

Descrita pela primeira vez no Reino Unido (SMITH et al., 1993), esta enfermidade é frequentemente fatal, afetando principalmente suínos de 6 a 16 semanas de idade (SMITH et al., 1993, THIBAUT et al., 1998). Animais acometidos apresentam lesões cutâneas derivadas de uma vasculite necrotizante grave que afeta a derme e o tecido subcutâneo, caracterizada por uma inflamação nos vasos sanguíneos, acompanhada por necrose epidermal, ulceração e hemorragia da derme (SMITH et al., 1993, RAMOS-VARA et al., 1997, THIBAUT et al., 1998). O rim encontra-se com volume aumentado, com múltiplos focos hemorrágicos na região cortical e os linfonodos renais e inguinais estão frequentemente aumentados e hemorrágicos (RAMOS-VARA et al., 1997).

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

1.3.2.2. Complexo das doenças respiratórias dos suínos

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

1.3.2.3. Falhas reprodutivas

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

O tropismo celular do PCV2 parece mudar com a idade do suíno. Fetos infectados *in utero* aos 57, 75 e 92 dias de gestação tiveram diferentes distribuições do vírus no tecido. Fetos inoculados aos 57 dias tinham elevada quantidade de vírus em cardiomiócitos e, em menor escala, em macrófagos e hepatócitos. Na fase final da gestação ou após o nascimento, o vírus foi encontrado principalmente em macrófagos e era escasso em outros tecidos (SANCHEZ et al., 2001).

1.3.2.4. Tremor congênito

O tremor congênito suíno (TCS) ou mioclonia congênita é caracterizado por tremores da cabeça e dos membros em recém nascidos. Dois tipos de TCS têm sido descritos com base na deficiência (tipo A) ou não (tipo B) de mielina no sistema nervoso central e periférico (SEGALÉS et al., 2004). Em adição, o TCS tipo A tem sido subdividido em 5 subtipos diferentes (AI-AV), associados a anormalidades genéticas,

intoxicação por triclorfon em fase intra-uterina e infecção uterina por alguns vírus. O TCS subtipo AII é a forma mais comum de tremores congênitos e é caracterizado por contrações clônicas com grau de severidade variado, mas que diminuem ou cessam a partir da quarta semana de idade. A associação do PCV2 com tremores congênitos é controversa. Utilizando hibridização *in situ*, imunofluorescência indireta e PCR, foi demonstrada a presença de ácido nucléico e antígenos de PCV2 no cérebro e medula espinhal (STEVENSON et al., 2001). Porém, outros autores não confirmam essa ligação do PCV2 com TCS (KENNEDY et al., 2003).

1.3.3. CONTROLE E PREVENÇÃO DA CIRCOVIROSE

1.3.3.1. Boas práticas de manejo

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

A implementação dos "20 Pontos de Madec" demonstrou ser eficaz na diminuição da percentagem de mortalidade em granjas severamente afetadas por SMDS (MADEC et al., 2000). Resumidamente, as recomendações incluem procedimentos de desinfecção, uso do sistema *all-in-out*, limitar o contrato entre animais, evitar a mistura de lotes, isolar/sacrificar animais doentes, manter adequado o fluxo de ar e a temperatura nas instalações, desvermifugar o rebanho e seguir um esquema de vacinação.

A desinfecção do ambiente reduz a pressão de infecção pelo PCV2, quando utilizados desinfetantes à base de fenóis, amônia quaternária, agentes oxidantes e álcalis, enquanto que etanol, iodo, formaldeído ou clorexidine não são eficazes para inativação do vírus (ROYER et al., 2001).

1.3.3.2. Soroterapia

Antes da disponibilidade de vacinas comerciais, soroterapia foi amplamente utilizada em rebanhos europeus (OPRIESSNIG et al., 2008). Esta prática consistia na inoculação subcutânea ou intramuscular de soro de animais convalescentes em animais

saudáveis. Em rebanhos que utilizaram esta técnica foi observada significativa redução da doença clínica e da mortalidade (WADDILOVE e MARCO, 2002), porém este procedimento requer a colheita de soro hiperimune, o que é trabalhoso e aumenta o risco de reintrodução de agentes patogênicos no rebanho.

1.3.3.3. Vacinação

1.3.3.3.1. Vacinas comerciais

Ao menos quatro vacinas comerciais contra Circovirose estão atualmente disponíveis nos principais países produtores de carne suína (Tabela 2). A primeira vacina do mercado foi a CIRCOVAC® (Merial), produzida a partir do vírus inativado e utilizada inicialmente em porcas e marrãs entre 2ª e 4ª semana antes da parição. Os outros três produtos comerciais são vacinas recombinantes utilizadas em suínos de 3-4 semanas de idade. A Suvaxyn PCV2® (Fort Dodge) é baseada em um vírus quimérico contendo a ORF2 do PCV2 inserida no genoma do PCV1 (FENAUX et al., 2003). As vacinas Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim) e a Circumvet® (Intervet Schering-Plough) são vacinas de sub-unidade baseadas na expressão da ORF2 em baculovírus. Todas as quatro vacinas são baseadas em cepas PCV2a.

Estudos de campo utilizando vacinas comerciais têm demonstrado a eficácia das mesmas. O ganho médio diário, a melhor conversão alimentar, a diminuição da mortalidade e redução de custos de medicamentos são alguns dos benefícios observados em rebanhos vacinados (FACHINGER et al., 2008, KIXMOLLER et al., 2008). A vacinação de fêmeas em idade reprodutiva demonstrou uma melhora nos parâmetros reprodutivos dos plantéis vacinados, como o aumento de leitões nascidos vivos e leitões por porca por ano e redução de leitões mumificados (THACKER et al., 2008). Entretanto, a vacinação não preveniu a infecção pelo PCV2 de porcas prenhes, nem a transmissão do PCV2 via colostro, sugerindo que a vacinação em porcas prenhes não impeça a transmissão vertical do vírus (MADSON et al., 2009).

No Brasil, até julho de 2007, apenas as vacinas autógenas estavam disponíveis. As vacinas autógenas eram preparadas a partir de tecidos de suínos infectados, os tecidos eram então triturados, homogeneizados e inativados com formaldeído (MORÉS et al., 2007). Os produtores em geral relatavam diminuição significativa da mortalidade

após a aplicação da vacina autógena. Todavia, devido aos riscos biológicos que estas vacinas apresentam, estas foram substituídas pelas vacinas comerciais.

TABELA 2 – Vacinas comerciais utilizadas no controle da Circovirose suína

	Ingelvac CircoFLEX®	Suvaxyn PCV2®	Circumvet®	CIRCOVAC®
Fabricante	Boehringer	Fort Dodge	Intervet	Merial
Antígeno	Proteína Cap do PCV2	PCV1-2 quimérico inativado	Proteína Cap do PCV2	PCV2 inativado
População alvo	Leitões ($\geq 3^*$)	Leitões ($\geq 4^*$)	Leitões ($\geq 3^*$)	Fêmeas prenhes (2-4**) Leitões ($\geq 3^*$)
Dose/posologia	1x 1 mL	1x 2 mL	2x 2 mL	Fêmeas: 2 mL Leitões: 0,5 mL

* Semanas de idade; ** Semanas antes do parto.

Adaptado de Mores et al. (2007).

Até o momento, existem poucos estudos do mecanismo de proteção induzido pela vacinação. Em geral, assume-se que a eficácia da vacina depende do efeito protetor dos anticorpos induzidos contra o PCV2, quer adquiridos passivamente (via colostro) ou ativamente (vacinação dos leitões). No entanto, a indução de baixo título de anticorpos ou a falta de desenvolvimento de anticorpos após a vacinação, nem sempre esta relacionada com falhas vacinais. Após a vacinação com um vírus quimérico PCV1-2, embora nem todos os suínos apresentassem soroconversão para o PCV2, após desafio, os animais vacinados não apresentaram sinais clínicos e não desenvolveram viremia (FENAUX et al., 2004). Os autores desse estudo sugerem um potencial papel da imunidade celular na proteção induzida pela vacina.

1.3.3.3.2. Vacinas experimentais

Além das vacinas comerciais, protótipos de outras vacinas foram desenvolvidos e testados em vários modelos. Estes incluem vacinas de DNA (BLANCHARD et al., 2003, KAMSTRUP et al., 2004, FAN et al., 2008b, LEFEBVRE et al., 2008, SHEN et

al., 2008), vacinas baseadas em vetores virais (BLANCHARD et al., 2003, FENAUX et al., 2004, JU et al., 2005, WANG et al., 2007, FAN et al., 2008a) ou vetores bacterianos expressando proteínas virais de PCV2 (WANG et al., 2008, KIM et al., 2009). Os dados dos estudos anteriormente mencionados permitem compreender melhor a resposta imune gerada pelas diferentes ORFs do PCV2 e suas correspondentes proteínas codificadas e serão discutidos a seguir.

1.3.3.3.2.1. Vacinas de DNA

Embora nenhuma vacina de DNA contra PCV2 tenha alcançado o mercado, alguns estudos vêm comprovando sua eficácia na indução da resposta imune. Kamstrup et al. (2004) demonstraram que 1 mg da vacina de DNA expressando a ORF2 do PCV2 induzia anticorpos em camundongos. Em suínos vacinados com DNA plasmidial recombinante expressando o gene *cap* ou *rep*, estes soroconverteram uma semana após o desafio, enquanto que o grupo controle soroconverteu na semana posterior e apresentou redução no ganho de peso em relação ao grupo vacinado (BLANCHARD et al., 2003).

Em camundongos que foram imunizados com a proteína recombinante do capsídeo ou a ORF2 clonada em um vetor de expressão (100 µg), verificou-se que o nível de anticorpos neutralizantes induzido pela vacina de DNA foi significativamente maior do que o induzido pela vacina contendo a proteína recombinante (SHEN et al., 2008). Todavia, a quantidade de DNA recombinante necessária para produção da vacina contra PCV2, acaba onerando os custos de produção e tornando a vacina comercialmente inviável.

O perfil de citocinas sistêmicas foi avaliado em camundongos vacinados com DNA plasmidial expressando os genes codificados pelas ORF1, ORF2 ou ORF3 (LEFEBVRE et al., 2008). A vacinação com a ORF1 elevou a expressão de citocinas relacionadas com a resposta mediada por Th-1 (IFN- γ) e Th-2 (IL-13), enquanto que a vacinação com a ORF2 aumentou a imunidade humoral e a expressão da citocinas relacionadas com a resposta por Th-2 (IL-10). Todavia, a vacinação com a ORF3 produziu altos níveis de TNF- α , sendo esta a provável *causa mortis* dos nove dos quinze camundongos vacinados, uma vez que o TNF- α pode induzir febre, destruição do tecido e, em alguns casos, choque e morte (DINARELLO, 2000). Esta citocina também é

apontada como uma das possíveis causas de algumas das principais manifestações clínicas da SMDS, tais como perda de peso progressiva (KIM et al., 2006).

1.3.3.3.2.2. Vacinas baseadas em vetores virais

Ju et al. (2005) construíram um recombinante do vírus da doença de Aujeszky (PRV) contendo um cassete de expressão das proteínas Rep e Cap fusionadas (PRV-PCV2). Linfócitos coletados de camundongos e de suínos imunizados com PRV-PCV2, quando em contato com proteína do capsídeo do PCV2 foram estimulados a proliferar, indicando que houve indução de uma resposta celular. Neste mesmo estudo, verificou-se uma resposta mediada por anticorpos anti-PCV2 em camundongos. Outro recombinante utilizou o PRV como vetor para expressão da ORF2 e foi capaz de induzir respostas humoral e celular em suínos vacinados com o recombinante (SONG et al., 2007).

Um adenovírus recombinante expressando a ORF2 do PCV2 foi utilizado para imunização de camundongos, os quais desenvolveram anticorpos anti-PCV2 (WANG et al., 2006). Este mesmo recombinante foi utilizado em um experimento de imunização/desafio em suínos e foi observada uma redução dos sinais clínicos e das lesões patológicas induzidas por PCV2 (WANG et al., 2007).

A VP2, uma proteína do capsídeo do parvovírus suíno com capacidade de gerar “partículas semelhantes a vírus” (VLPs), foi modificada pela introdução da sequência que codifica os resíduos 165-200 da proteína do capsídeo do PCV2, considerada a região imunodominante da ORF2 do PCV2, dando origem a uma forma híbrida da VP2 (PAN et al., 2008). Essa por sua vez foi clonada e expressa em adenovírus (rAd- Δ Cap- Δ VP2), gerando VLPs semelhantes ao parvovírus, porém com um epítipo imunogênico da proteína do capsídeo. Camundongos imunizados com rAd- Δ Cap- Δ VP2 produziram anticorpos neutralizantes contra PCV2 e, em ensaios de linfoproliferação *in vitro*, apresentaram índices de estimulação significativamente maiores do que os controles (PAN et al., 2008).

Outro vetor viral utilizado foi o PCV1 para a produção de um vírus PCV1-2 quimérico (FENAUX et al., 2004). Estudos comprovaram que o vírus quimérico PCV1-2 é apatogênico (FENAUX et al., 2003) e animais vacinados com o PCV1-2 quimérico quando inoculados com PCV2 ($10^{3,5}$ DICC₅₀) não apresentaram viremia, enquanto que 75% (9/12) dos animais controle foram virêmicos (FENAUX et al., 2004).

Blanchard et al. (2003) compararam a eficácia de vacinas de DNA com a de vacinas de subunidade produzidas em baculovírus para as proteínas Rep e Cap do PCV2. Em experimento de vacinação/desafio em suínos, estes autores demonstraram que a vacina de proteínas recombinantes teve melhor desempenho do que a vacina de DNA e que a proteína codificada pela ORF2 foi o principal imunógeno do PCV2.

Um pseudotipo de baculovírus recombinante expressando a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G); capaz de infectar células de mamíferos (BARSOUM et al., 1997), foi utilizado como “vacina viva” contra o PCV2 (FAN et al., 2008a). Neste experimento, o recombinante foi construído de modo a expressar a proteína Cap de PCV2 e a VSV-G. Quando inoculado em camundongos, o vírus induziu maior resposta imune celular e humoral contra PCV2 do que a vacina de DNA (FAN et al., 2008a).

Larvas de *Trichoplusia ni* foram utilizadas para produzir um vacina da proteína Cap do PCV2 expressa em baculovírus (PEREZ-MARTIN et al., 2008). Os autores verificaram que a vacinação dos suínos induziu proteção contra a infecção experimental pelo PCV2. A vacina inibiu tanto a viremia quanto a excreção viral, sendo a proteção correlacionada com a indução de resposta imune humoral específica.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais:

- Padronizar e comparar ensaios moleculares para a detecção do PCV2.
- Construir potenciais candidatos vacinais para o controle da circovirose suína.

2.2. Específicos:

- *Artigo I:*
 - Utilizar a técnica da ACR para amplificação do genoma do PCV2.
 - Sequenciar e genotipar amostras locais de PCV2.
 - Comparar a sensibilidade das técnicas de ACR e PCR.
 - Produzir clones virais a partir do genoma viral amplificado através da ACR.
- *Artigo II:*
 - Utilizar as técnicas de PCR em tempo real e PCR competitivo para quantificação de DNA viral de PCV2.
 - Determinar a carga viral de PCV2 em amostras de tecido de suínos saudáveis e naturalmente afetados pela SMDS.
 - Comparar as técnicas de PCR em tempo real e PCR competitivo, como forma auxiliar no diagnóstico da SMDS.
- *Artigo III:*
 - Expressar a proteína do capsídeo do PCV2 utilizando baculovírus como vetor de expressão.
 - Introduzir modificações na proteína do capsídeo do PCV2 de modo a permitir altos níveis de expressão.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Nesta seção serão descritos os trabalhos experimentais, organizados sob a forma de artigos científicos elaborados durante o período de execução do doutorado.

Artigo I: *Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation*

Artigo publicado no periódico *Research in Veterinary Science* 88 (2010) 436-440.



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation

Diogenes Dezen^{a,*}, Franciscus Antonius Maria Rijsewijk^b, Thais Fumaco Teixeira^a, Carine Lidiane Holz^c, Samuel Paulo Cibulski^a, Ana Cláudia Franco^b, Odir Antonio Dellagostin^d, Paulo M. Roehle^{a,b}

^aLaboratório de Virologia, FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Caixa Postal 47, Eldorado do Sul, 92990-000 RS, Brazil

^bDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmento Leite 500, Porto Alegre, 90050-170 RS, Brazil

^cCIRAD, Département Systèmes Biologiques, UR-15, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, France

^dCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 October 2009

Keywords:

Swine
Porcine circovirus type 2
PMWS
Rolling-circle amplification
Infectious copy

ABSTRACT

Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) was used to amplify porcine circovirus type 2 (PCV2) genomes isolated from tissues of pigs with signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Two of the amplified PCV2 genomes were cloned in prokaryotic plasmids and sequenced. Both were nearly identical (1767 nt) except for one silent substitution in the region coding for the capsid protein (ORF2). In addition, they showed high nucleotide sequence similarity with PCV2 isolates from others countries (93–99%). To investigate whether the MPRCA amplified PCV2 genomes could be used to produce infectious virus, the cloned genomes were isolated from the plasmids, recircularized and used for transfection in PK-15 cells. This procedure led to the production of infectious virus to titres up to $10^{5.55}$ TCID₅₀/mL. It was concluded that MPRCA is a useful tool to amplify PCV2 genomes aiming at sequencing and virus isolation strategies, where particularly useful is the fact that it allows straightforward construction of PCV2 infectious clones from amplified genomes. However, it was less sensitive than PCR for diagnostic purposes.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a member of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae* (Pringle, 1999). It is closely related to porcine circovirus type 1 (PCV1), a non-pathogenic contaminant detected in the PK-15 cell lineage (Tischer et al., 1982). The overall DNA sequence identity within either PCV1 or PCV2 isolates is greater than 90%, whereas the similarity between PCV1 and PCV2 isolates was reported to vary from 68% to 76% (Hamel et al., 1998). The PCV2 virion comprises a non-enveloped capsid with a diameter of about 17 nm, displaying an icosahedral symmetry and packaging a single-stranded circular DNA genome of about 1.76 kb (Mankertz et al., 2004).

PCV2 is distributed worldwide in swine herds and is a serious cause of economical losses for the pig industry. The virus is regarded as the major infectious agent involved in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), an emerging disease of swine described in the late 90s, characterized by progressive weight loss, respiratory signs and jaundice (Clark, 1997). Macroscopic lesions include granulomatous interstitial pneumonia, lymphadenopathy, granulomatous hepatitis and nephritis (Allan et al.,

1998). Other clinical manifestations have also been linked to PCV2 infections, such as porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), an immune-mediated vascular disease affecting the skin and kidney (Smith et al., 1993), reproductive failure (Kim et al., 2004) and the porcine respiratory disease complex (Kim et al., 2003).

In search for a method to detect PCV2 genomes, we employed the so called “multiply-primed rolling-circle amplification” (MPRCA). MPRCA was designed for the isothermal (sometimes referred to as “cold”) amplification of circular DNA templates (Dean et al., 2001). The process is based on random primed amplification of circular DNA by the DNA polymerase of bacteriophage Phi 29 (Dean et al., 2001). By strand displacement synthesis, a high molecular-weight DNA is produced in the form of repeated copies of the template. From these, linearized copies of the full genome can be excised with a restriction enzyme which recognizes a single cleavage site on the viral genome (Rector et al., 2004). The method has been successfully used for the detection of a number of viruses (Rector et al., 2004; Niel et al., 2005; Johne et al., 2006b; Navidad et al., 2008).

Here we describe the use of MPRCA to detect and amplify the full genome of PCV2 isolated from tissues of pigs displaying clinical signs for PMWS and studies to determine the diagnostic value of such a method. In addition, viral DNA amplified by MPRCA was

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3481 3711; fax: +55 51 3481 3337.
E-mail address: ddezen@gmail.com (D. Dezen).

cloned, sequenced and used in transfections in order to determine whether such DNA would give rise to infectious virus.

2. Materials and methods

2.1. Tissue samples

Ten, eight to twelve week-old pigs displaying clinical signs of PMWS were received from pig farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. At arrival, pigs were displaying dyspnoea, enlargement of superficial inguinal lymph nodes, pallor, jaundice and diarrhoea. Animals were subjected to necropsy and tissue samples from kidneys, liver, lungs, mesenteric lymph nodes and spleen were collected and stored at -70°C until used.

2.2. DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)

DNA extraction was performed as described elsewhere (Van Engelenburg et al., 1993), modified as follows; 10 mg of tissue were minced and digested for 4 h at 37°C in 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) containing 0.5% SDS and 0.1 mg proteinase K. DNA was extracted twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), precipitated with two volumes of 100% ethanol and kept at 20°C for 1 h. The DNA was washed in 70% ethanol, air dried and resuspended in 100 μl of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). For the PCR 100 ng of total DNA extracted were used and the reactions were performed as described previously (Kim et al., 2001).

2.3. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA)/restriction enzyme analysis (REA) and cloning

The samples of each tissue were used in multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) reactions. A MPRCA protocol (Niel et al., 2005) was carried out in 25 μl volumes with 100 ng of the total extracted DNA.

A restriction enzyme analysis (REA) was performed using 5 μl of MPRCA products and 1 U of *EcoRI* (Invitrogen) or *NcoI* (NEB) which are expected to cleave the PCV2 - but not PCV1 - genome at a single site. The products obtained from REA were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized on a UV source. Fragments of 1.7 kb, which correspond to the size of PCV2 genome, were purified using a commercial kit (GFX PCR DNA and gel band purification kit, GE Healthcare) and cloned into the *EcoRI* site of pCR2.1 using TOP10 *Escherichia coli* cells, as describe elsewhere (Sambrook and Russell, 2001).

2.4. Nucleotide sequence analysis

The genomes of samples, named 15/5P and 15/23R, were sequenced. Isolated plasmid DNA was purified using the GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) and the inserts were sequenced in both strands at least four times in a MegaBACE (GE Healthcare) apparatus, with the Dyenamic ET terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare) using the primers described in Table 1. The obtained sequences were assembled in the SeqMan program (DNASar Inc) and were submitted to NCBI database, GenBank Accession Nos. DQ923523 and DQ923524.

2.5. Phylogenetic analyses

The obtained sequences were assembled with SeqMan software (DNASar Inc) and similarity analysis was performed with NCBI-BLAST (Altschul et al., 1997). The complete genome sequences so generated were aligned with three PCV2 sequences proposed as

Table 1
Oligonucleotides used for sequencing of PCV2 genomes from cloned DNA (in plasmid pCR2.1).

Primer	Sequence (5'-3')
1F	ACC AGC GCA CTT CCG CAG
418F	TGA GTA CCT TGT TGG AGA GC
1095F	CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG
1286F	GTA ATC CTC CGA TAG AGA GC
433R	TCC AAC AAG GTA CTC ACA GCA G
886R	GTA ATC CTC CGA TAG AGA GC
1696R	GGT GTC TTC TTC TGG GGT AAT G
1768R	AAT ACT TAC AGC GCA CTT CTT TCG
1549R	ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

prototypes for genotypes a, b and c, according to Segalés et al. (2008), available at GenBank. As an outgroup, a PCV1 sequence was included in the alignment (for Accession Nos. see Fig. 2). Sequences were aligned with the ClustalW program within the MEGA3.1 package (Kumar et al., 2004). Phylogenetic analyses of nucleotide sequences were performed using the Neighbour-Joining (NJ) method in the MEGA 3.1 software package, based on Kimura two-parameter distance estimation method. Bootstrap resampling was performed for each analysis (1000 replications) and the genomes were classified in PCV2a, PCV2b or PCV2c genotypes, as proposed by the EU consortium on porcine circovirus diseases (Segalés et al., 2008).

2.6. Transfection

The recombinant plasmids were digested with *EcoRI* and the 1.7 kb fragment was isolated from 0.7% agarose gel using GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare). The isolated fragment was recircularized using 4 U of T4 DNA ligase (Invitrogen) and then transfected in PCV1-free PK-15 cells. The cells were grown in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Soral-y), non-essential amino acids and glutamine (Gibco). One day before transfection 1.5×10^5 cells were added to each well of a 24 well plate. The cells were transfected with 1 μg of recircularized PCV2 genome and 3 μl of lipofectamine (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Two days after the transfection the plate was frozen at -80°C and the cell lysates were titrated. The virus was detected using a modified immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Kramps et al., 1994), using a rabbit anti-PCV2-Cap polyclonal serum as a primary antibody and a anti-rabbit IgG (HRP) (Zymed) as a secondary antibody. The anti-PCV2 serum was purchased from the College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA. Its production was described elsewhere (Sorden et al., 1999).

3. Results

3.1. PCR and MPRCA/REA

The presence of PCV2 DNA was confirmed by PCR in all samples. However, in MPRCA followed by digestion with *EcoRI*, that cuts the PCV2 genome only once, only 27 (54%) out of 50 samples, corresponding to eight out 10 animals, produced a 1.7 kb fragment (Fig. 1). The remaining 23 samples did not give rise to a fragment compatible with the expected size of the PCV2 genome. Thus, successful viral DNA amplification was achieved in 70% of samples from spleen and kidney, in 50% of samples from mesenteric lymph nodes and in 40% of liver and lung samples (Table 2). These results were reassessed by digestion of the same samples with *NcoI*. Again the same 27/50 samples were digested giving rise to a DNA frag-

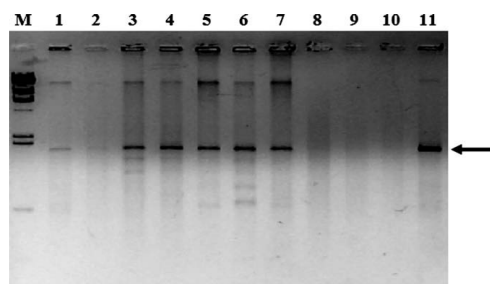


Fig. 1. Detection of PCV2 DNA by MPRCA followed by digestion with *EcoRI*. Lane M, Lambda \times *HindIII* ladder; lanes 1, 3–7 and 11: positive samples; 2 and 8–10: negatives samples. Arrow indicates the expected size of the PCV2 genome (1.7 kb).

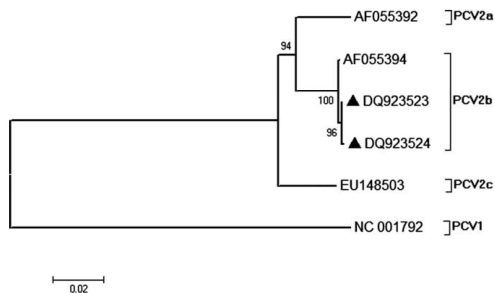


Fig. 2. Phylogenetic relationships between PCV2 genotypes based on nucleotide sequences. PCV1 was used as an outgroup. Black triangles indicate the two PCV2 genomes sequenced in this study (PCV2b genotype). The tree was inferred with the MEGA3.1 program using the Neighbour-Joining method with the evolutionary distances computed by the Kimura-2 parameter method. Bootstrap values above 50% are indicated. Bars represent units of substitution per nucleotide.

ment of the expected size (1.7 kb), whereas the remainder were not. This conformed that amplification of PCV2 genome was solely achieved on those 54% of the examined samples.

3.2. Cloning and sequencing

The two samples (15/5P and 15/23R) were fully sequenced. Both sequences were 1767 nt long and differed only at nucleotide position 1603 where sample 15/5P has a guanine residue and sample 15/23R has a thymine residue. Both nucleotide sequences

showed a genetic organization characteristic of PCV2 with an origin of replication located in the untranslated region, a coding region for the Rep proteins (ORF1) on the sense strand and a coding region for the capsid protein (ORF2) and for a protein associated with apoptosis (ORF3) on the anti-sense strand.

3.3. Phylogenetic analyses

The NCBI-BLAST analysis with the obtained genome sequences revealed that the degree of identity for both vary from 93% to 99% with PCV2 and 67% to 74% with PCV1. The constructed phylogenetic tree grouped the isolates 15/5P and 15/23R in PCV2b genotype (Fig. 2).

3.4. Transfection

The recircularized double-stranded DNA of PCV2 transfected genome gave rise to infectious virus; the supernatant of the culture was able to infect new cell cultures and antigens could easily be visualized through immunostaining with IPMA (Fig. 3). Infectious virus titres obtained with transfected DNA reached $10^{5.3}$ TCID₅₀/mL and $10^{5.55}$ TCID₅₀/mL for isolates 15/5P and 15/23R, respectively.

4. Discussion and conclusions

MPRCA has been reported as a highly efficient technique, yielding about 20–30 μ g of product from as few as 1–10 copies of human genomic DNA (Dean et al., 2002). However, here it was not as sensitive as the PCR, since PCV2 DNA was detected in all samples by PCR, whereas MPRCA was able to detect PCV2 in only 54% of the samples (Table 2). As total DNA was used in the reactions, this low sensitivity may have been due to competition for primers and dNTPs, since MPRCA is based on random amplification and the amount of viral DNA is rather less abundant than genomic DNA in a sample. To ascertain whether viral DNA had not been missed in samples which did not give rise to a DNA fragment of the expected size after restriction enzyme digestion, an *in silico* restriction enzyme analysis (not shown) was carried out on 528 complete PCV2 genome sequences deposited in GenBank. From those, 96.8% have a single site for *EcoRI*, whereas 98.5% have a single restriction site for *NcoI*. Therefore, no additional restriction sites for those enzymes were to be expected in the samples examined here. Thus, the failure of MPRCA to detect viral DNA on those was not related to the addition of extra restriction enzyme sites; it seems more likely that MPRCA was just not sensitive enough to achieve that. Nevertheless, despite its relatively low sensitivity in comparison to the PCR employed here, MPRCA allowed recovery of the full PCV2 genome from at least one tissue from 8 out of

Table 2

PCR or MPRCA/REA detection of PCV2 DNA performed on tissues of animals with clinical signs of PMWS. Positive and negative signs refer to presence or absence of PCV2 DNA. Kd: kidney; Li: liver; Lu: lung; Ln: lymph node; Sp: spleen; ST: subtotal.

Animal ID	PCR						MPRCA/REA					
	Kd	Li	Lu	Ln	Sp	ST (%)	Kd	Li	Lu	Ln	Sp	ST (%)
1	+	+	+	+	+	100	+	–	–	+	+	60
2	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	100
3	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	100
4	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	+	100
5	+	+	+	+	+	100	+	–	–	–	–	20
6	+	+	+	+	+	100	+	+	–	+	+	80
7	+	+	+	+	+	100	+	–	–	–	+	40
8	+	+	+	+	+	100	–	–	+	–	+	40
9	+	+	+	+	+	100	–	–	–	–	–	0
10	+	+	+	+	+	100	–	–	–	–	–	0
Total (%)	100	100	100	100	100	100	70	40	40	50	70	54

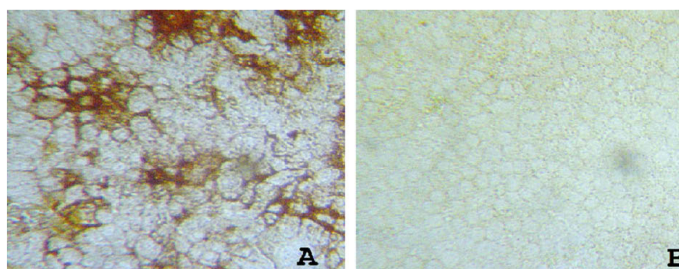


Fig. 3. Immunoperoxidase monolayer assay using anti-PCV2-Cap polyclonal serum as primary antibody: (A) PK-15 cells infected with the supernatant obtained from the transfection with recircularized PCV2 genome. The reddish-brown coloration indicates PCV2 antigens; (B) negative control: uninfected PK-15 cells. Original magnification: 100 \times . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the 10 animals tested (Table 2). This may be highly advantageous, particularly if sequencing of the full genome is required - as it has usually been the case when small DNA genomes are searched for. MPRCA was shown to bear additional advantages over usual PCR amplification, since it does not require thermocyclers for amplification and no equipment other than a water bath or incubator at 30 °C is necessary, bringing down the costs of the procedure (Dean et al., 2001). In addition, MPRCA is performed in a single step, allowing detection of viral DNA even with no previous knowledge of the target sequence. It has, though, the disadvantage of requiring further restriction enzyme cutting (Johne et al., 2006a).

Perhaps the greatest advantage of MPRCA over other amplification methods is that it facilitates enormously the process of construction of PCV2 infectious clones from amplified genomes. The abundance of viral DNA generated makes cloning quite straightforward. The transfection of recircularized double-stranded PCV2 DNA gave rise to infectious virus to titres of up to $10^{5.55}$ TCID₅₀/mL, confirming the infectious nature of the cloned genomes and the capacity of the viral progeny obtained to generate fully infectious PCV2 virions. However, the direct transfection of MPRCA products from infected tissues does not guarantee that there is only one isolate in the sample. As the PCV2 genomic DNAs were recovered from cloned material, it is possible to ensure that no other adventitious contamination was introduced. Other authors have used carried out transfections with the digested material directly from the MPRCA; however, this might lead to the presence of more than one isolate in the transfection mix (Ferreira et al., 2008). In addition, the method used here allowed a rapid recovery of infectious virus. PCV2 propagation in cell culture by conventional methods can be time consuming and rarely gives rise to infectious titres equal to or greater than $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL (Zhu et al., 2007). The approach employed here could be used as an alternative method for virus isolation and propagation.

In the present study, MPRCA was less sensitive than the PCR employed here for diagnostic purposes. However, it was highly useful to amplify full length PCV2 genomes from tissues of infected pig tissues, with the advantage that MPRCA does not require thermal cycling and gives rise to full genome copies. Such full length genomic DNA can provide nucleotide sequences of high quality and may also be used for straightforward generation of infectious PCV2 clones.

The results of the phylogenetic analyses revealed that the two samples from which PCV2 genomes were sequenced (15/5 and 15/23) can be assigned to the PCV2b genotype, according to the classification scheme proposed by Segalés et al. (2008). Recently published data on Brazilian PCV2 sequences reported PCV2b as the most frequently genotype detected amongst Brazilian PCV2 genomes (Ciacci-Zanella et al., 2009).

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the present paper.

Acknowledgements

We thank Dr. David Driemeier (UFRGS) for providing tissues of swine with PMWS. Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). DD was in receipt of a Master's grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). PMR is a CNPq 1C research fellow and FAMR is a CNPq visiting scientist.

References

- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.G., 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 USA and Europe. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 3–10.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
- Ciacci-Zanella, J.R., Simons, N.L., Pinto, L.S., Viancilli, A., Fernandes, L.T., Hayashi, M., Dellagostin, O.A., Esteves, P.A., 2009. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Research in Veterinary Science* 87, 157–160.
- Clark, E.G., 1997. Post-weaning wasting syndrome. In: *Proceedings of the American Association on Swine Practitioners*, Quebec, Canada, pp. 499–501.
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., Lasken, R.S., 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research* 11, 1095–1099.
- Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M., Lasken, R.S., 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 5261–5266.
- Ferreira, P.T.O., Lemos, T.O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *Journal of Virological Methods* 147, 351–354.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* 72, 5262–5267.
- Johne, R., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Muller, H., 2006a. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology* 87, 1189–1195.
- Johne, R., Wittig, W., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Muller, H., 2006b. Characterization of two novel polyoma viruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *Journal of Virology* 80, 3523–3531.
- 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.
- Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 166, 251–256.

- Kim, J., Jung, K., Chae, C., 2004. Prevalence and detection of porcine circovirus 2 in aborted and stillborn piglets. *The Veterinary Record* 155, 114–115.
- Kramps, I.A., Magdalena, J., Quak, J., Weedermeeter, K., Kaashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Keil, G., van Oirschot, J.T., 1994. A simple, specific and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2175–2181.
- Kumar, S., Takamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.
- Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., 2004. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology* 98, 81–88.
- Navidad, P.D., Li, H., Mankertz, A., Meehan, B., 2008. Rolling-circle amplification for the detection of active porcine circovirus type 2 DNA replication in vitro. *Journal of Virological Methods* 152, 112–116.
- Niel, C., Diniz-Mendes, L., Devalle, S., 2005. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *Journal of General Virology* 86, 1343–1347.
- Pringle, C.R., 1999. Virus taxonomy at the XIth international congress of virology, Sydney, Australia. *Archives of Virology* 144, 2065–2070.
- Rector, A., Bossart, G.D., Ghim, S.J., Sundberg, J.P., Jenson, A.B., Van Ranst, M., 2004. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris* papillomavirus type 1. *Journal of Virology* 78, 12698–12702.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 1, third ed. Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, pp. 1.84–1.87.
- Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmus, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition nomenclature. *The Veterinary Record* 162, 867–868.
- Smith, W.J., Thompson, J.R., Done, S., 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *The Veterinary Record* 132, 47.
- Sorden, S.D., Harms, P.A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D., Paul, P.S., 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 528–530.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single stranded DNA. *Nature* 295, 64–66.
- Van Engelenburg, F.A.C., Maes, R.K., Van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A.M., 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 3129–3135.
- Zhu, Y., Lau, A., Lau, J., Jia, Q., Karuppanan, A.K., Kwang, J., 2007. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology* 369, 423–430.

Artigo II: *Comparative evaluation of a competitive PCR and a SYBR green based real-time PCR to quantify porcine circovirus type 2 DNA in swine tissue samples*

Artigo aceito no periódico **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** na forma de artigo científico.

Comparative evaluation of a competitive polymerase chain reaction (PCR) and a SYBR Green–based real-time PCR to quantify *Porcine circovirus-2* DNA in swine tissue samples

Diogenes Dezen,¹ Franciscus A.M. Rijsewijk, Thais F. Teixeira, Carine L. Holz, Ana P. Varela, Samuel P. Cibulski, Tatiane Shäffer Gregianini, Helena B.C.R. Batista, Ana C. Franco, Paulo M. Roehle

From the Laboratório de Virologia, FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (Dezen, Teixeira; Varela, Cibulski, Roehle); the Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Rijsewijk, Batista); CIRAD, Département Systèmes Biologiques, UR-15, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France (Holz); and Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Greggianini).

¹Corresponding Author: Diogenes Dezen, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Rodovia SC 283, Km 08 S/Nº - Fragosos, Concórdia, 89700-000 Santa Catarina, Brazil. ddezen@gmail.com

Running title: Comparison of quantitative PCR assays for PCV-2

Abstract. *Porcine circovirus-2* (PCV-2) is considered the major etiological agent of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. The clinical manifestations of the disease are correlated with moderate to high amounts of PCV-2 DNA in biological samples of affected pigs. A threshold of 10^7 DNA copies/ml is suggested as the trigger factor for symptoms. A comparative study was conducted to determine which quantitative method would be more suitable to estimate the PCV-2 DNA load. Two polymerase chain reaction (PCR) assays were developed: a competitive PCR (cPCR) and a SYBR Green-based real-time PCR. The assays were compared for their capacity to detect PCV-2 in DNA samples extracted from liver, lung, spleen, mesenteric lymph nodes, and kidney of PMWS-affected ($n = 23$) or non-PMWS-affected pigs ($n = 9$). Both assays could successfully quantify PCV-2 DNA in all tissue samples and were able to detect significant differences between the numbers of PCV-2 DNA copies found in tissues of PMWS-affected and non-PMWS-affected pigs ($\geq 10^{2.5}$). The highest mean viral loads were detected by the SYBR Green real-time PCR, up to $10^{7.0 \pm 1.5}$ copies/100 ng of total DNA sample, while the cPCR detected up to $10^{4.8 \pm 1.5}$. A mean difference of $10^{1.8}$ was found between the amounts of PCV-2 DNA detected, using the SYBR Green real-time PCR and the cPCR, suggesting that the viral load threshold for PMWS should be determined for each particular assay.

Key words: Competitive polymerase chain reaction; DNA viral load; *Porcine circovirus-2*; real-time polymerase chain reaction.

Introduction

Porcine circovirus-2 (PCV-2; family *Circoviridae*, genus *Circovirus*) is distributed worldwide in swine herds and is an important cause of economic losses for the pig industry.⁶ The virus is regarded as the major infectious agent involved in the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).^{1,9,20} However, PMWS is a multifactorial disease where PCV-2 is necessary but not sufficient for its development.¹³ Typical PMWS signs include progressive weight loss, signs of respiratory impairment, and jaundice (Clark EG: 1997, Post-weaning wasting syndrome. *In*: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners 28:499–501). Macroscopic lesions include granulomatous interstitial pneumonia, lymphadenopathy, and granulomatous hepatitis and nephritis.² Microscopically, PMWS is characterized by macrophage infiltration, syncytia formation, and inclusion bodies in cells of lymphoid tissues.²⁶ PCV-2 is also associated with other pathological conditions, including congenital tremors,³⁰ respiratory disease,¹⁴ porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS),³ abortions,³³ and other reproductive disorders.²¹ Diseases associated with PCV-2 are collectively termed porcine circovirus diseases (PCVD),²⁸ or porcine circovirus-associated disease (PCVAD).²² Healthy pigs can also be infected with PCV-2, but such pigs will bear lower viral loads than diseased animals. The sole presence of anti-PCV-2 antibodies and/or PCV-2 DNA is not sufficient to establish a definitive PMWS diagnosis, which is usually performed by analyzing data from clinical signs, histopathology, and detection of PCV-2 within tissue lesions.^{6,28}

Among the methods available to detect viral DNA, a substantial number of assays have been described based on variations of the polymerase chain reaction (PCR),^{16,23,35} multiply-primed rolling-circle amplification,⁸ loop-mediated isothermal amplification,⁷ and microarray analyses.¹² However, as PCV-2 is ubiquitously present in swine regardless of disease status, methods based on qualitative PCR are not appropriate for the establishment of a definitive PMWS diagnosis. In view of that, different types of quantitative PCR assays have been developed to measure the amount of PCV-2 DNA in animals, including a competitive PCR (cPCR)¹⁷ and several real-time PCR-based assays.^{5,19,29,32,34} In cPCR, the target DNA and an internal standard, the so-called competitor, are simultaneously amplified; the 2 fragments must be recognized by the same pair of primers.³⁶ The initial amount of target DNA is obtained by a comparison between the intensity of the bands of the target DNA and the competing DNA upon gel electrophoresis.³⁶ On the other hand, real-time PCR-based assays

generate a fluorescent signal during the amplification cycle, which is directly correlated with the amount of target DNA molecules as well as inversely with the number of PCR cycles needed to reach a fluorescent signal threshold.¹⁰

In the present study, a cPCR and a SYBR Green–based real-time PCR were developed and evaluated to establish the most suitable method to determine the amount of PCV-2 DNA in swine tissue samples from PMWS-affected or healthy pigs, in an attempt to contribute to the diagnosis of PMWS.

Material and methods

Tissue samples

Tissue samples were collected from 23 PMWS-affected (PMWS group) and 9 healthy, non-PMWS-affected (non-PMWS group) pigs. The 5–8-week-old pigs of the PMWS group were obtained from pig farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. At arrival, the pigs were showing clinical signs of PMWS, such as wasting, dyspnea, enlargement of superficial inguinal lymph nodes, pallor, jaundice, and diarrhea. These animals were subjected to necropsy following the general recommendations of COBEA (Brazilian Committee on Experimental Animal Care). Histopathological and immunohistochemical tests of tissues from animals in this group confirmed the PMWS diagnosis. The healthy, non-PMWS-affected group consisted of samples collected from finishing-age pigs (16–18 weeks old) randomly chosen in a slaughterhouse. Samples were collected from kidneys, livers, lungs, mesenteric lymph nodes, and spleens from all animals. The samples were stored at –70°C until used.

DNA extraction

The DNA extraction method was performed as described elsewhere,³¹ with minor modifications, as follows. Ten milligrams of tissue were minced and digested for 4 hr at 37°C in 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris,^a 1 mM ethylenediamine tetra-acetic acid [EDTA],^b 100 mM NaCl^c) containing 0.5% sodium dodecyl sulfate^d and 0.1 mg proteinase K.^e The DNA was extracted twice with 1 ml phenol^e:chloroform^f:isoamyl alcohol^f (25:24:1). After centrifugation, 2 volumes of 100% ethanol^f were added to the water phase, and the mixture was kept at –20°C for 2 hr. After this, the mixture was centrifuged, and the obtained DNA pellet was washed with 70% ethanol,^f air-dried, and re-suspended in 100 µl of TE (10 mM Tris,^a 1 mM EDTA,^b pH 7.4).

Oligonucleotides used in the PCR assays

The nucleotide sequences of the primers used for the cPCR were based on a published qualitative PCV-2 PCR.¹⁵ The primers used were 1094F (5'-CGGATA TTGTAGTCCTGGTCG-3') and 1569R (5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA-3'). These oligonucleotides anneal within the open reading frame-2 region of the PCV-2 genome at nucleotides 1094–1114 (numbers based on PCV-2 genome 15/5P⁸ of GenBank accession no. DQ923523) and at nucleotides 1548–1569, respectively. Amplification with such primers should give rise to an amplicon with an expected size of 476 base pairs (bp).

The primers used for the SYBR Green real-time PCR were designed using PrimerSelect software⁸ and were chosen from within the region amplified by the cPCR (Fig. 1A). The designed primers were 1127F (5'-TCGAACGCAGTGCCGAG-3') and 1190R (5'-AGCTGTGGCTGAGACTACAAACT- 3'), and were complementary to nucleotides 1027–1043 and 1190–1168 of the PCV-2 15/5P genome (GenBank accession no. DQ923523). The primers were expected to amplify a fragment of 64 bp and were different from the ones used for the cPCR because the maximum recommended size of an amplicon for a real-time PCR is 200 bp.²⁴

Competitive PCR

The cPCR reactions were performed using a fixed amount of DNA (100 ng) extracted from the tissue samples to be examined, plus a variable amount of competitor plasmid p572 (see below). The 25- μ l reaction volume contained 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate,^h 3 mM MgCl₂,^e 10 pmol of each primer (1094F and 1569R), 1 U of Taq polymerase,^e 100 ng of DNA sample, and 2 μ l of competitor plasmid DNA p572. For each tested sample, 11 reactions were assembled using one of the p572 diluted DNA, which ranged from 10¹⁰ to 10⁰ DNA copies added per tube. A negative control sample was added between each 4 tissue samples under testing, where test DNA was substituted by 100 ng DNA extracted from PK-15 (porcine kidney epithelial) cells.ⁱ The reaction was performed as follows: initial incubation at 94°C for 4 min, 35 cycles at 94°C for 30 sec, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Five microliters of the amplification products were analyzed on 1.5% agarose gel. The equivalence point, at which the bands of the target DNA (476 bp) and competitor (572 bp) had equal intensities, were determined on agarose gel by visual inspection and densitometric scanning using the KDS software.^j

Construction of a competing template

Using the cPCR protocol described above, an amplicon with the expected size (476 bp) was produced by amplification of DNA from the PCV-2 isolate 15/5P. The obtained amplicon was ligated into the cloning vector pCR 2.1-TOPO^e and used to transform competent *Escherichia coli* cells. The resulting plasmid was named p476. Plasmid DNA was isolated from an overnight culture of transformed *E. coli* cells using standard methods.²⁷ To construct the competitor template that would generate a slightly larger amplicon, p476 was cleaved with *Stu* I,^k and a 96-bp fragment was inserted into the site, resulting in plasmid p572. The 96-bp fragment was obtained through PCR using primers 1672F (5'-CTGGCCAAGATGGCTGCG -3') and 1767R (5'-AATACTTACAGCGCACTT-3'), and the 15/5P PCV-2 isolate DNA as a template (Fig. 1B).

Quantitation of plasmid DNA copy numbers and Co-amplification of PCV-2 DNA with competitor DNA

DNA from plasmids p476 and p572 was quantified in an ethidium bromide-stained agarose gel. The amount of plasmid DNA was determined by comparing the intensity of the obtained bands with those of the mass DNA ladder^k (0.75 µg/ lane) performed with the aid of the KDS software.^j The number of plasmid DNA copies were calculated assuming an average molecular mass of 660 Da for each base pair of double-stranded DNA. The calculation was performed using the following equation: number of DNA copies per nanogram = $(N_A \times 10^{-9}) / (n \times mw)$, where N_A is the Avogadro constant (6.02×10^{23} molecules/mol), n is the size of the plasmid in base pairs (4407 bp for p476 or 4503 bp for p572), and mw is the molecular weight per bp (660 Da). Plasmid DNA was then diluted in DNase-free water^e to a final concentration of 10^{10} molecules/2 µl, and 10-fold serially diluted. The dilutions were used with both the cPCR (p572) and the SYBR Green real-time PCR (p476).

To test whether the insertion of 96 bp within the PCV-2 target sequence changed the amplification performance of p572, 10-fold dilutions of equal amounts of the target DNA (p476) and competing DNA (p572) were co-amplified using the cPCR protocol mentioned above.

SYBR Green real-time PCR

The SYBR Green real-time PCR reactions were set up with 10 μ l of SYBR Green PCR master mix,¹ 5 pmol of each primer (1127F and 1190R), and 100 ng DNA sample in a total volume of 20 μ l. As a negative control, 100 ng of DNA extracted from uninfected PK-15 cells were used. All real-time reactions (standards, test samples, and controls) were performed in duplicate. The reported results are an average of these duplicates. The SYBR Green real-time PCR were performed in a commercial system¹ employing the following cycling conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C and 45 sec at 60°C. A dissociation curve was performed after amplification by a gradual rise in temperature from 60 to 95°C. Data analysis was performed with the aid of the SDS software 1.3.1.¹ The number of copies of viral DNA was determined by comparison with a standard curve (see below).

Standard curve for the SYBR Green real-time PCR

To create a standard curve for the SYBR Green real-time PCR, 10-fold dilutions (10^{10} – 10^0) of plasmid p476 were used as target DNA templates. The standard curve was constructed by plotting the plasmid copy number on a \log_{10} scale against the measured threshold cycle (Ct) values. One hundred nanograms of total DNA extracted from PK-15 cellsⁱ were used as negative control. The reactions were carried out as described above.

Specificity and sensitivity of cPCR and SYBR Green real-time PCR

The specificity of cPCR and SYBR Green real-time PCR were studied with respect to *Porcine circovirus-1* (PCV-1). Duplicates of 100 ng total DNA of PK-15 cells permanently infected with PCV-1 were analyzed under the optimal conditions of the assays as determined above. SYBR Green real-time PCR and cPCR sensitivity was tested in triplicates using 10-fold dilutions (10^{10} – 10^0 copies/reaction) of p476 plasmid DNA as standard and 100 ng of DNA extracted from PCV-2–free tissue samples.

Statistical analysis

In order to normalize the acquired data for statistical analysis, the number of copies of PCV-2 DNA obtained by the 2 PCR assays under comparison was transformed in \log_{10} . Descriptive statistics, Pearson correlation coefficient, and analysis of variance were performed using the SPSS 16.0 software^m; differences were considered significant when $p \leq 0.05$. In order to determine the agreement between the 2 assays, the Bland–Altman plot was constructed based on differences of PCV-2 copy numbers

(SYBR Green real-time minus cPCR) against their means.⁴ The MedCalc softwareⁿ (version 11.5.0.0) was used for this analysis, and the significance was accepted at $p \leq 0.05$.

Results

Co-amplification of PCV-2 DNA with competitor DNA

The amplification of the competitor template produced a band of predicted size (572 bp), which was clearly distinguishable from the 476-bp viral amplicon (Fig. 2). The efficiency of amplification was equivalent for both target and competitor DNA, because over the range of 10^{10} – 10^1 DNA copies, the intensities of the amplified bands were the same for the p476 and p572 templates (data not shown).

Specificity and sensitivity of the cPCR and SYBR Green real-time PCR

Neither a specific band with the cPCR (Fig. 2, lane 6) nor any significant fluorescence signal could be detected by SYBR Green real-time PCR when PCV-1 DNA sample was used. Negative controls did not give rise to any amplification product; therefore, no peaks were observed on the dissociation curve. The observed temperature of dissociation of the 64-bp amplicon occurred between 79.3°C and 80.3°C (Fig. 3B). Nevertheless, the PK-15 cells used as PCV-2–negative control were indeed positive for PCV-1, as demonstrated with a primer pair specifically designed for PCV-1¹⁵ amplification in a qualitative PCR (data not shown). On the sensitivity assays, SYBR Green real-time PCR and cPCR showed similar sensitivity, detecting from 10^{10} to 10^1 copies of plasmid DNA per reaction.

Standard curve for the SYBR Green real-time PCR

The generated standard curve covered a linear range of 10^1 – 10^{10} p472 DNA copies (Fig. 3A), and the value of the linear regression (R^2) calculated between DNA copy number and Ct value was 0.993. The detection limit found on this assay was 10 copies of PCV-2 DNA per sample.

Determination of viral load

The average PCV-2 DNA load detected by cPCR in the PMWS-affected group ranged from $10^{3.9}$ to $10^{4.8}$ per 100 ng of total DNA (Fig. 4A). This was significantly

higher than the viral load measured on tissues samples of the non-PMWS-affected group ($10^{0.22}$ – $10^{0.57}$ copies/100 ng of sample DNA; $p \leq 0.05$). No statistically significant differences were found on amounts of PCV-2 DNA detected in different types of tissues. None of the tissue samples from the non-PMWS-affected pigs had PCV-2 DNA loads greater than 10^2 copies per 100 ng DNA sample, as determined by cPCR.

Results obtained with the SYBR Green real-time PCR showed that, in the PMWS-affected group, the average PCV-2 DNA loads were significantly higher ($10^{6.96}$ PCV-2 DNA copies/100 ng DNA sample) than in the non-PMWS group ($10^{0.92}$ PCV-2 DNA copies/100 ng DNA sample; Fig. 4B). Within the groups, no statistical differences were detected among the values of PCV-2 DNA copies found in the different types of tissues. An exception was the mean PCV-2 DNA load detected in the spleens of the non-PMWS group, where PCV-2 DNA concentration was significantly higher than in the mesenteric lymph nodes ($p \leq 0.05$). None of the sample from the non-PMWS-affected group had a PCV-2 DNA load higher than $10^{4.4}$ copies per 100 ng of DNA sample.

Comparison of the PCR-based assays

A strongly positive correlation (0.77) was found between the assays, as determined by Pearson correlation coefficient. On the Bland-Altman plot, the results showed that the viral loads detected from SYBR Green real-time PCR were significantly higher than those from cPCR. The mean difference between the assays was $10^{1.8}$ PCV-2 DNA copies per 100 ng of DNA sample, with limits of agreement being $10^{-2.0}$ – $10^{5.6}$ (Fig. 5). The prevalence of PCV-2 DNA on the sample was analyzed, and approximately 90% of the samples were positive or negative in both assays (Table 1). Eleven out of the 160 samples analyzed were positive for PCV-2 in SYBR Green real-time PCR but negative in cPCR, whereas the opposite was observed on 4 samples.

Discussion

In the current study, a cPCR and SYBR Green real-time PCR were developed and compared to establish which of the 2 tests would be more appropriate to quantify PCV-2 DNA in PMWS-suspected pigs. Both methods examined were able to detect significant differences between the viral loads in tissues of PMWS-affected and non-affected pigs. However, the amounts of PCV-2 DNA detected by the cPCR were $10^{1.8}$

lower than those detected by the SYBR Green real-time PCR. A possible explanation for the difference might be the degree of similarity of the putative binding sites of the primers and the actual nucleotide sequences of the isolates. In comparing 587 PCV-2 genome sequences deposited in GenBank with the primers used with the cPCR (1569R and 1094F)¹⁵ assay, most of the PCV-2 genome sequences display up to 3 mismatches in the binding site for primer 1569R and up to 1 mismatch for primer 1094F. In contrast, the binding sites for the primers developed for the SYBR Green real-time PCR, 1190R and 1127F, were much more conserved; most of the PCV-2 genome sequences displayed up to 1 mismatch for 1190R and no mismatch for 1127F.

Mismatches might alter the amplification performance, resulting in the detection of lower amounts of DNA.²⁵ It has been shown that 5 mismatches in primers and probe resulted in an underestimation of copy numbers by 1 log₁₀ unit, while a total of 6 mismatches resulted in 2 log₁₀ units underestimation of the copy numbers.⁵ A 3–5 log₁₀ difference between perfectly matched primers and 3 mismatches in one primer has been reported in quantitative PCR.¹⁸ Another possible explanation for the different sensitivity detected between the assays is that clinical samples contain contaminants that affect cPCR more than SYBR Green real-time PCR. However, this explanation is unlikely, as the amplification of the competitor DNA was not affected.

In the cPCR developed in the current study, according to the tissue sample analyzed, the detected average varied from 10^{3.9} to 10^{4.8} PCV-2 DNA copies per 100 ng DNA sample in the PMWS group. A similar cPCR-based test detected an average of 10^{6.6} copies of PCV-2 DNA in 1 ml of serum from PMWS-affected pigs,¹⁷ which is equivalent to 10^{5.3} copies per 100 ng DNA sample. Therefore, the detected viral load of the cPCR employed in the present study was approximately 3–25-fold lower than that achieved in a prior study.¹⁷ This difference between the 2 cPCR assays may be due, *inter alia*, to different sensitivities of the methods, the stage of the disease, or the type of sample used in the assays.

SYBR Green real-time PCR detected higher mean amounts of PCV-2 DNA in PMWS-affected ($\leq 10^7$) than in non-PMWS-affected pigs ($\leq 10^{2.3}$). The differences between groups varied from 2.5 to 4 log₁₀ units, depending on the tissue samples examined (see Fig. 4B). Using a SYBR Green-based real-time PCR^{19,34} or a TaqMan-based real-time PCR,⁵ other authors detected similar viral loads to those reported in the current study with the real-time PCR. A statistically significant difference was found among spleen and mesenteric lymph node from the non-PMWS group, with higher viral

loads being detected in the spleen samples. This result suggests that mesenteric lymph node may not be the appropriate sample when monitoring PCV-2 levels in swine herds.

It has been proposed that a threshold of 10^7 PCV-2 DNA copies per ml serum or 2×10^6 copies per 100 ng DNA sample would be suggestive of PMWS.⁵ However, a study comparing 2 routinely used real-time PCR assays found a bias of $10^{1.4}$ on the PCV-2 DNA copies detected between the assays.¹¹ These findings revealed that the results of viral load among assays could vary, suggesting that the establishment of the viral load threshold to characterize PMWS should be determined by each particular assay. Variation in the detected PCV load was also observed in the quantitative PCR assays used in the current study. Based on the highest viral load detected in the non-PMWS group in the current study, the suggested viral load thresholds for clinically detectable PMWS are 10^2 and $10^{4.4}$ copies of PCV-2 DNA per 100 ng DNA (or $10^{3.3}$ and $10^{5.7}$ copies of PCV-2 DNA/500 ng DNA), for cPCR and SYBR Green real-time PCR, respectively.

Other authors have observed that the mean PCV-2 concentration (per gram or ml) was 10^3 higher in naturally PWMS- affected versus non-PWMS-affected pigs.¹⁹ Therefore, another approach in support of a PMWS diagnosis is to compare DNA viral loads found on samples of PMWS-affected and non-PMWS-affected pigs. Using such criterion, both described assays would allow proper diagnosis, since both methods detected differences of at least $10^{2.5}$ per 100 ng DNA.

With respect to the decision about which of the 2 assays would be more suitable to support a PMWS diagnosis, SYBR Green real-time PCR has a number of practical advantages.³⁶ This type of assay is less prone to false-positive results in comparison to cPCR because the risk of contamination is less, as post-PCR manipulation is unnecessary. As well, real-time PCR is less time consuming than cPCR, since no competitive DNA template is necessary, and multiple reaction dilutions as well as electrophoresis analyses are not needed. In addition, SYBR Green real-time PCR was more sensitive than cPCR, indicating that this method amplified the target DNA more efficiently, probably because more conserved primers were used.

In summary, both cPCR and SYBR Green real-time PCR can be applied to discriminate between PMWS and non-PMWS pigs. Either a threshold value for the PCV-2 DNA load or the difference in PCV-2 DNA load between PMWS and non-PMWS pigs could be used for diagnostic purposes. The difference between the assays may not be inherent to the cPCR method and could probably be solved by the use of

more conserved primers. Although both methods may thus be used to support a PMWS diagnosis, SYBR Green real-time PCR is preferable because of a number of practical advantages and because it was able to detect higher amounts of PCV-2 DNA copies.

Acknowledgements

The authors thank Dr. David Driemeier, from the Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), for providing tissue samples of swine with PMWS. To FAMR, in memoriam.

Sources and manufacturers

- a. Gibco BRL, Grand Island, NY.
- b. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- c. Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.
- d. Promega Corp., Madison, WI.
- e. Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.
- f. Synth, Diadema, São Paulo, Brazil.
- g. DNASTAR Inc., Madison, WI.
- h. GE Life Sciences, Piscataway, NJ.
- i. CCL-33 American Type Culture Collection, Manassas, VA.
- j. Eastman Kodak Company, Rochester, NY.
- k. New England Biolabs, Ipswich, MA.
- l. 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA.
- m. SPSS Inc., Chicago, IL.
- n. MedCalc, Mariakerke, Belgium.
- o. Fermentas Life Science, Glen Burnie, MD.

Funding

Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). D. Dezen was in receipt of a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). P.M. Roehe is a CNPq 1B research fellow.

References

1. Allan G, Meehan B, Todd D, et al.: 1998, Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142:467–468.
2. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al.: 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10:3–10.
3. Allan GM, McNeilly E, Kennedy S, et al.: 2000, PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146:711–712.
4. Bland JM, Altman DG: 1986, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307–310.
5. Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM: 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122:171–178.
6. Chae C: 2004, Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168:41–49.
7. Chen HT, Zhang J, Sun DH, et al.: 2008, Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 149:264–268.
8. Dezen D, Rijsewijk FA, Teixeira TF, et al.: 2010, Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res Vet Sci* 88:436–440.
9. Ellis J, Hassard L, Clark E, et al.: 1998, Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39:44–51.
10. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026–1030.
11. Hjulsager CK, Grau-Roma L, Sibila M, et al.: 2009, Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol* 133:172–178.
12. Jiang Y, Shang H, Xu H, et al.: 2010, Detection and genotyping of porcine circovirus in naturally infected pigs by oligo-microarray. *Res Vet Sci* 89:133–139.

13. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, et al.: 2000, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122:9–24.
14. Kim J, Chung HK, Chae C: 2003, Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 166:251–256.
15. Kim J, Han DU, Choi C, Chae C: 2001, Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 98:25–31.
16. Larochelle R, Morin M, Antaya M, Magar R: 1999, Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Québec as determined by PCR. *Vet Rec* 145:140–142.
17. Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk LA: 2000, Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38:3474–3477.
18. Markowski-Grimsrud CJ, Miller MM, Schat KA: 2002, Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. *J Virol Methods* 101:135–147.
19. McIntosh KA, Tumber A, Harding JC, et al.: 2009, Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet Microbiol* 133:23–33.
20. Nayar GP, Hamel A, Lin L: 1997, Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J* 38:385–386.
21. O'Connor B, Gauvreau H, West K, et al.: 2001, Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 42:551–553.
22. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG: 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19:591–615.
23. Park JS, Ha Y, Kwon B, et al.: 2009, Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* 140:208–211.

24. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, et al.: 2005, Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 43:5491–5497.
25. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP: 2007, Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol* 9:87–102.
26. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, et al.: 1999, Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120:59–78.
27. Sambrook J, Russell DW: 2001, Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *In: Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol. 1, pp. 116-118. Spring Harbour Laboratory Press, New York.
28. Segalés J, Allan GM, Domingo M: 2005, Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6:119–142.
29. Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, et al.: 2005, Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111:223–229.
30. Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, et al.: 2001, Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 13:57–62.
31. Van Engelenburg FAC, Maes RK, van Oirschot JT, Rijsewijk FA: 1993, Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol* 31:3129–3135.
32. Vilcek S, Vlasakova M, Jackova A: 2010, LUX real-time PCR assay for the detection of porcine circovirus type 2. *J Virol Methods* 165:216–221.
33. West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, et al.: 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11:530–532.
34. Yang ZZ, Habib M, Shuai JB, Fang WH: 2007, Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. *J Zhejiang Univ Sci B* 8:162–169.
35. Yue F, Cui S, Zhang C, Yoon KJ: 2009, A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine

pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes* 38:392–397.

36. Zentilin L, Giacca M: 2007, Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nat Protoc* 2:2092–2104.

Table 1. Prevalence and viral loads of *Porcine circovirus-2* DNA detected on swine tissue samples using SYBR Green real-time PCR or competitive polymerase chain reaction (cPCR).*

	No. of samples	cPCR (mean \pm SD.log₁₀)	SYBR Green real-time (mean \pm SD.log₁₀)
Positive results in both assays	128 (79.4)	4.1 \pm 1.63	6.35 \pm 2.07
Positive results only in cPCR	4 (2.5)	1.0 \pm 0.0	Negative
Negative results only in cPCR	11 (6.9)	Negative	2.13 \pm 0.93
Negative results in both assays	18 (11.2)	Negative	Negative

* Numbers in parentheses are percentages.

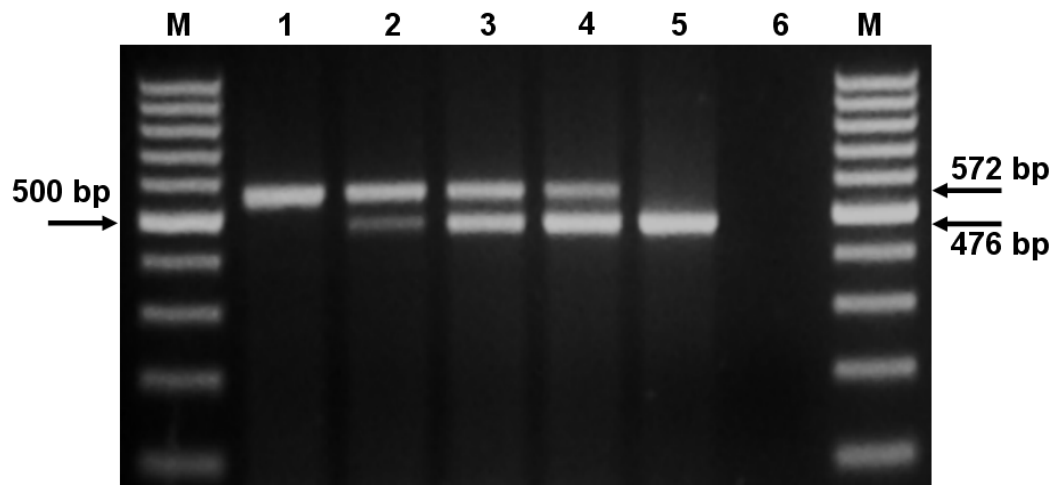


Figure 2. Electrophoretic analysis of the products of the competitive polymerase chain reaction (cPCR) on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M: a 100-bp ladder,^o the left arrow points to the 500-bp fragment; lanes 1–5: cPCR products from reactions performed on 100 ng of tissue DNA plus variable amounts (10^6 – 10^2 molecules) of competitor plasmid (p572) DNA; lane 3: equivalence point— 10^4 molecules of PCV-2 DNA in the tissue sample and 10^4 molecules of competitor plasmid p572; lane 6: negative control (100 ng of PK-15 DNA).

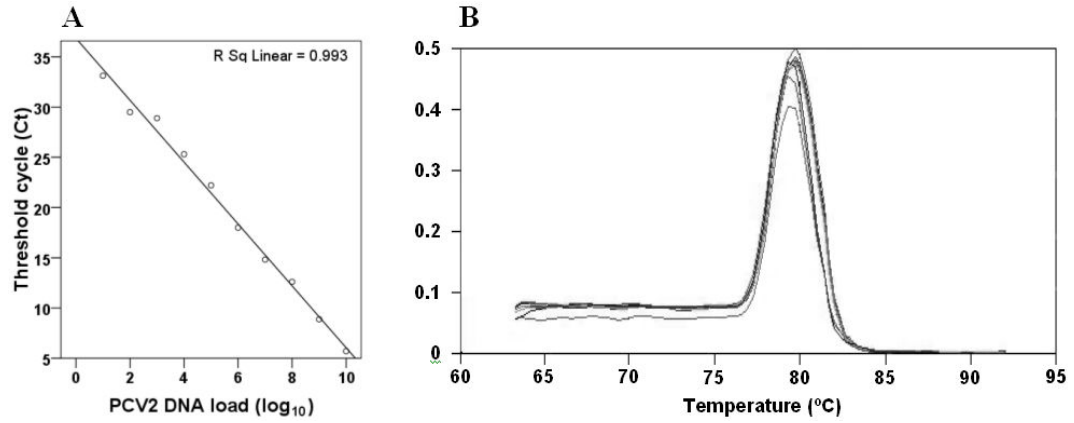


Figure 3. **A**, standard curve constructed based on the amount of *Porcine circovirus-2* (PCV-2) DNA copies versus the threshold cycle (Ct) obtained on SYBR Green real-time polymerase chain reaction (PCR). A 10-fold dilution series of plasmid p476 was used as PCV-2 DNA template. Each point in the graph represents the mean Ct value of a duplicate measurement. The amounts of p476 molecules are given on a log₁₀ scale. **B**, dissociation curves of the SYBR Green real-time PCR products of PCV-2-positive samples.

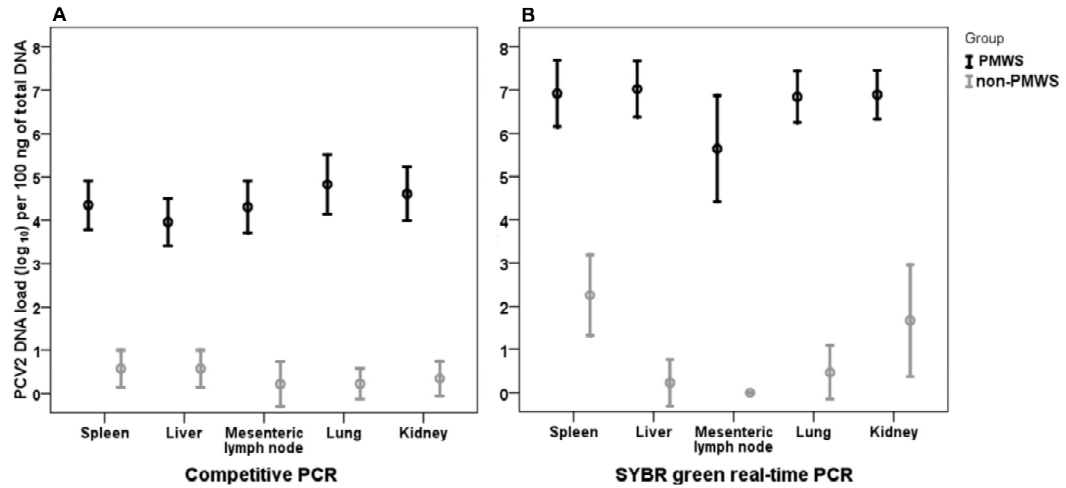


Figure 4. Mean values and standard deviations of the number of *Porcine circovirus-2* (PCV-2) DNA molecules detected by competitive polymerase chain reaction (cPCR; **A**) and the SYBR Green real-time PCR (**B**) in 5 different tissues from either post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs (n = 23) or non-PMWS pigs (n = 9). The data are given in log₁₀ scales.

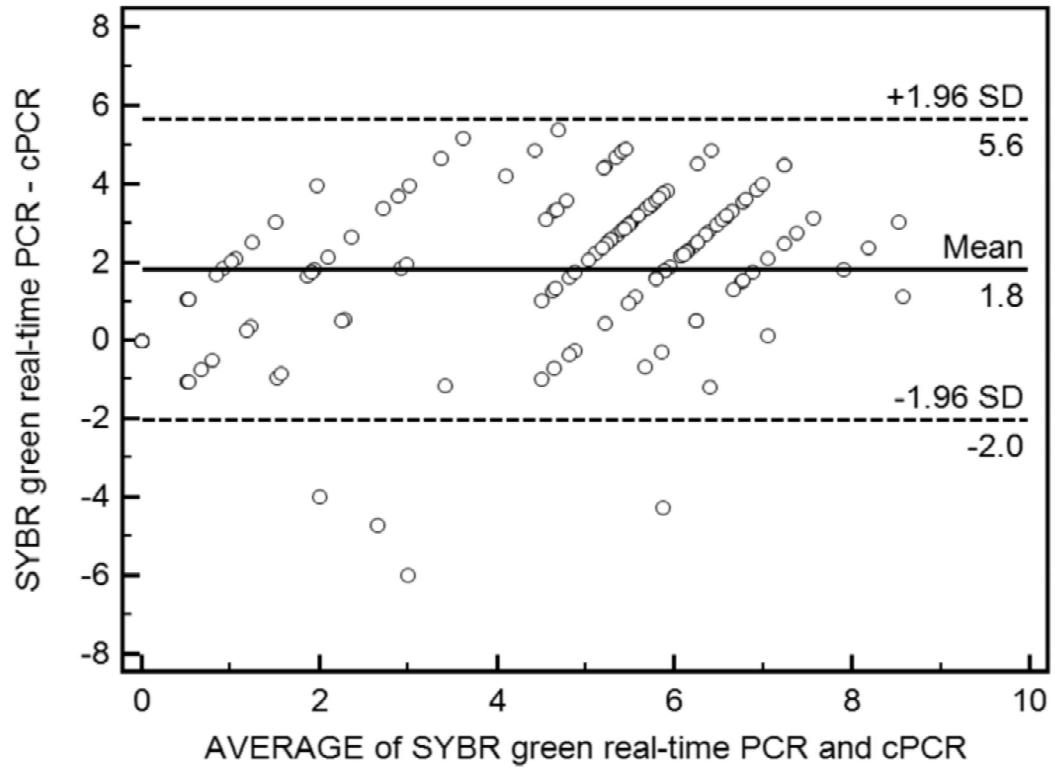


Figure 5. Bland–Altman plot of the differences between *Porcine circovirus-2* DNA loads detected by and competitive polymerase chain reaction (cPCR) and SYBR Green real-time PCR. The solid line indicates the mean difference among the paired measurements, and the dashed lines indicate a 95% limit of agreement.

Artigo III: *Development of recombinant baculoviruses expressing PCV2 capsid protein*

Dados preliminares de um trabalho em fase de conclusão para submissão na forma de artigo científico em periódico.

Development of recombinant baculoviruses expressing PCV2 capsid protein

Diogenes Dezen^{1,2}, Franciscus A.M. Rijsewijk³, Thais F. Teixeira², Ana P. Varela²,

Samuel P. Cibulski², Hiran C. Kunert², Ana C. Franco³, Paulo M. Roehé^{2,3}.

1. Corresponding author's present address: Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia. Rodovia SC 283, Km 08 S/Nº - Fragosos, Concórdia, 89700-000 SC, Brazil.

E-mail: ddezen@gmail.com

2. Laboratório de Virologia, FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), caixa postal 47, Eldorado do Sul, 92990-000 RS, Brazil

3. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, 90050-170 RS, Brazil.

Abstract

A baculovirus expression vector system was used to generate three recombinant viruses expressing the capsid (Cap) protein, the immunodominant protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) which is encoded by ORF2. On two recombinants, the nucleotide sequence from bovine herpesvirus glycoprotein I (BoHV-gI) signal peptide was inserted at the 5' end of the ORF2 nucleotide sequence. Additionally, one recombinant containing the signal peptide nucleotide sequence was constructed lacking the nuclear localization signal (NLS) of Cap protein. Through immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), the PCV2 antigens were detected in Sf21 cells infected by the three recombinant viruses. The results suggests that the recombinants here described are potential vaccine candidates, once they were able to produce the viral antigen.

Keywords: porcine circovirus type 2, PMWS, baculovirus, signal peptide, nuclear localization signal

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the major infectious agent associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), an economically important swine disease worldwide (Allan et al., 1998; Segales et al., 2005). PMWS is clinically characterized by wasting and growth retardation, but other signs such as fever, pallor of the skin, respiratory distress and diarrhoea are observed (Chae, 2005; Harding, 1998). Histopathological lesions are characterized by lymphocyte depletion and histiocytic infiltration of lymphoid tissues (Allan et al., 1999; Ellis et al., 2004).

PMWS is defined as a multifactorial disease, in which PCV2 is required, and the influence of concomitant infections, genetic predisposition and alterations of the immune system could be potential triggering factors for the development of the disease (Segales et al., 2005).

The control of PMWS are mainly based on management practices (Madec et al., 2000) and vaccination (Fachinger et al., 2008; Fort et al., 2008; Kixmoller et al., 2008). Currently, there are at least four commercially available PCV2 vaccines. These are either based on inactivated PCV2 or PCV1/PCV2 chimeras (Fenaux et al., 2004) or on subunit vaccines containing the Cap protein expressed in baculovirus (Fachinger et al., 2008; Fort et al., 2008).

In addition to the commercial vaccines, several of PCV2 vaccine prototypes have been developed, including DNA vaccines (Blanchard et al., 2003; Fan et al., 2008b; Kamstrup et al., 2004), bacterial-vectored vaccines (Liu et al., 2001b; Wang et al., 2008), and recombinant virus-vectored vaccines (Fan et al., 2008a; Ju et al., 2005; Wang et al., 2006). Most of the vaccine prototypes were based on the expression of the PCV2 capsid protein (Cap), considered the only structural viral protein and the major viral immunogenic determinant (Cheung and Bolin, 2002; Mankertz et al., 2004; Nawagitgul et al., 2000). The 41 amino acid residues located at N-terminus of Cap protein contains a nuclear localization signal (NLS) that target the protein to the cell nucleus (Liu et al., 2001a). The expression of Cap protein, at least in prokaryotic systems, is influenced by the NLS, once the Cap protein without NLS was expressed successfully in *E. coli* whereas no Cap protein with NLS was observed (Zhou et al., 2005).

Other element that can influence the level of protein expression is the signal peptide. Signal peptides are a 15–30 amino acid sequence located on N-terminus of secretory

proteins; the signal peptides direct the propeptide to the endoplasmic reticulum and through the secretory pathway (Nunnari and Walter, 1992; Rapoport, 1992; Sanders and Schekman, 1992). The addition (Guan et al., 1992; Petrovska et al., 2005), deletion (Alken et al., 2005) or replacement (Tessier et al., 1991) of the SP from a native protein can alter the protein expression levels.

The recombinant baculovirus expression vector systems (BEVS) have been successfully used to generate potential vaccine candidates for many different pathogens. The BEVS were developed in 1983 (Smith et al., 1983) and subsequently used to express a large variety of proteins. The BEVS has several advantages, such as high efficiency of expression, ease of purification, cost effectiveness of scaling up for production, and the safety of the system (O'Reilly et al., 1992). Aiming to generate PCV2 vaccine candidates, three recombinant baculoviruses were constructed to express PCV2 Cap protein. In two of the recombinants the bovine herpesvirus glycoprotein I (BoHV-gI) signal peptide was inserted at 5' end of the PCV2 cap gene (ORF2). In addition, the NLS of PCV2 Cap protein was deleted in one of the constructions containing the signal peptide.

Material and Methods

Virus and cells

Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK), ATCC CCL-22 and porcine circovirus type I (PCV1) free porcine kidney (PK-15) cells, originally obtained from ATCC CCL-33, were maintained in Eagles's minimal essential medium (E-MEM, Gibco). The medium was supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Nutricell), 100 mg/ml of streptomycin and 100 IU/ml of penicillin. *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells were used to propagate recombinant baculovirus and cultured in Grace's insect media (Invitrogen) supplemented with 10% FBS at 27°C. The PCV2b strain 15/5P used in this study was originally isolated from a pig with PMWS (Dezen et al., 2010). The isolate 15/5P was propagated in PCV1-free PK15 cells as previously described (Nawagitgul et al., 2000). The bovine herpesvirus (BoHV) type 1.1 strain Cooper (Esteves et al., 2008) was propagated in MDBK cells following standard procedures (Roehle et al., 1997).

Peptide signal predictions

The putative signal peptide was predicted using the deduced amino acid sequence of the PCV2 Cap protein (Genbank accession No. DQ923523) or BoHV glycoprotein I (BoHV-gI; Genbank accession no. AJ004801). The predictions were performed with SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) and SigCleave softwares via its respective web interfaces (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>), with default settings. The BoHV-gI was chosen based on information that the signal peptide is functional in baculovirus expression vector system (Tyborowska et al., 2000). The nucleotide sequence encoded by the predicted BoHV-gI signal peptide was used to design the primers.

Oligonucleotide design

Oligonucleotides were selected based on the nucleotide sequences of PCV2 Capsid protein and the putative BoHV-gI signal peptide (Table 1). A *Bam*HI restriction site and a Kozak consensus sequence (5' gctcaaa 3') were added on the primers P1 and P3. A *Hind*III site was added on the primer P2. Primers P4, P5, P6 and P7 were designed to contain both nucleotide sequences from PCV2 ORF2 and BoHV-gI signal peptide.

Amplification of the recombinant DNA fragments

At first, 15/5P (PCV2) and Cooper (BoHV-1.1) were submitted to extraction of total DNA following a standard phenol extraction protocol (Sambrook and Russell, 2001). Later the purified DNA was dissolved in 50 μ L TE (10mM Tris pH 7.4; 1mM EDTA pH 8.0). The extracted DNA samples were used as a template to generate the recombinant DNA fragments: rf.Cap, rf.SP.Cap and rf.SP. Δ SLN.Cap (Fig 1). The rf.Cap was obtained by amplification of PCV2 ORF2 with primers P1 and P2. To produce the rf.SP.Cap two DNA fragments previously amplified were fused with primers P2 and P3. Those fragments were firstly obtained using primers P3 and P4 to amplify the nucleotide sequence from BoHV-gI signal peptide, and primers P2 and P5 to amplify the nucleotide sequence of PCV2 ORF2. The rf.SP. Δ SLN.Cap was generated as described in rf.SP.Cap, except for P4 and P5 primers which were replaced by primers P6 and P7, respectively. The PCR reaction volume was 100 μ L containing 0.2 mM of each dNTPs, 1.2 mM MgSO₄, 10 pmol of the each primer pair, 2 U of *Pfx*50 DNA

polymerase and 2 μ L of DNA template. The reactions was performed as follows: initial incubation at 94°C for 15 s, 35 cycles at 94°C for 15 s, 65°C for 15 s and 68°C for 15 s, followed by a final extension at 68°C for 5 min.

Construction of transfer vectors.

The transfer plasmids were generated using the pFast-Bac Dual vector (Invitrogen). Five μ L of the recombinant DNA fragments obtained by PCR were cleaved with *Bam*HI and *Hind*III at 37°C for 1 h. The digested fragments were cloned under the regulation of the polihedrin promoter. The vector and insert were ligated with T4 ligase, and transformed into cells of *E. coli* strain Top10 (Invitrogen). The transformed cells were plated on medium containing ampicillin (100 μ g/ml). The extraction of plasmid DNA was performed following a standard protocol (Sambrook & Russel 2001) and the presence of the inserts was confirmed by restriction analysis.

Sequencing

Recombinant clones were sequenced to ensure its fidelity. The DNA from recombinant plasmids were purified using the GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) and the inserts were sequenced in a MegaBACE (GE Healthcare) apparatus, with the Dyanamic ET terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare) following the manufacturer's protocol. Each product was sequenced at least three times in both directions using the primers pFBD-F and pFBD-R. The sequences obtained were aligned using ClustalW on Mega 4 package.

Transposition

To generate a recombinant bacmid DNA, the recombinant transfer plasmids were transformed into DH10Bac competent cells (Invitrogen) and the gene of interest was transposed into the bacmid through *lacZ* gene disruption. White clones containing the recombinant bacmid were selected on Luria-Bertani agar plates containing 50 μ g/ml kanamycin, 7 μ g/ml gentamicin, 10 μ g/ml tetracycline, 200 μ g/ml X-gal and 40 μ g/ml IPTG. After incubation at 37 °C, the high molecular weight DNA (bacmid) was isolated from the overnight cultures using standard protocols previously described (King et al.,

2007). The transposition was confirmed by performing PCR with primers M13F(-40)Bac (5' gtt ttc cca gtc acg ac 3') and M13R (5' cag gaa aca gct atg ac 3'). The recombinant bacmids contained the recombinant DNA fragments rf.Cap, rf.SP.Cap and rf.SP.ΔSLN.Cap were named Bac.Cap, Bac.SP.Cap and Bac.SP.ΔSLN.Cap, respectively.

Transfection of Sf21 cells with recombinant bacmids

For each transfection 9×10^5 cells/ml were seeded in a 35 mm cell culture plate and allowed to attach for at least 1 h. Lipofectamine 2000 reagent (6 μ L) and the recombinant bacmid DNA (5 μ L) were diluted separately into 100 μ L of Grace's insect medium without antibiotics, and then combined to form lipid-DNA complexes, which was incubated at room temperature for 45 min. The lipid-DNA complexes were diluted to 1 mL with Grace's insect medium and laid over the washed Sf21 cells. The cells were incubated for 5 h at 27 °C, rinsed by Grace's insect medium and incubated for another 72 h. Recombinant baculovirus was harvested from the supernatant and amplified in 25 cm² flask culture. Techniques for plaque assay and virus titration were according to the Bac-to-Bac Baculovirus expression system protocol (Invitrogen).

Immunoperoxidase monolayer assay

The immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) was performed on 96-well plate. Two times 10^5 Sf21 cells were seeded per well and infected with 0.1 m.o.i. of Bac.Cap, Bac.SP.Cap, Bac.SP.ΔNLS.Cap or wild type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (wt.AcNPV). The plates were incubated at 27°C for two days, then the supernatant was discarded and the plates were air-dried and frozen at -80 °C. The PCV2 antigen was detected using a modified immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Kramps et al., 1994), using a rabbit anti-PCV2-Cap polyclonal serum as a primary antibody and an anti-rabbit IgG (HRP) (Zymed) as a secondary antibody. The anti-PCV2 serum was purchased from the College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA. Its production was described elsewhere (Sorden et al., 1999).

Results

Signal peptide prediction

Using SignalP 3.0 software, the analysis of amino acid sequence of the BoHV-gI revealed a signal peptide composed by 20 amino acids. The most likely cleavage site was found between Ser20 and Leu21 residues (Figure 2). No signal peptide was identified on the PCV2 Cap protein. The same results were obtained using SigCleave software.

PCR

The three recombinant DNA fragments were successfully obtained by PCR (Figure 3). The estimated product sizes were 702 bp, 764 bp and 642 bp for rf.Cap, rf.SP.Cap and rf.SP.ΔSLN.Cap, respectively.

Sequencing

The deduced amino acid sequences obtained from the sequenced recombinant plasmids were aligned with the PCV2 Cap protein and putative BoHV-gI signal peptide (Fig. 4). No mutation was detected on the recombinant plasmids used for transposition technique.

Immunoperoxidase monolayer assay

In the Sf21 cells infected by Bac.Cap, Bac.SP.Cap or Bac.SP.ΔSNL.Cap, the PCV2 antigens were easily visualized through immunostaining (Fig. 4). This result indicates that the recombinants were able to express the PCV2 Cap protein. A weaker staining was observed on the Bac.SP.ΔSNL.Cap infected cells when compared with the others recombinant virus. No staining was observed on wild type wt.AcNPV infected cells.

Discussion

In Sf21 cells infected by the recombinants, it was possible to detect PCV2 antigens through IPMA. Nevertheless, a weaker staining was observed in cells infected by Bac.SP.ΔSNL.Cap. Once the signal intensity detected on the IPMA correlates with the

amount of antigen present in the sample, the observed weaker staining might be caused by the following reasons: a) loss of antigenic epitopes, b) lower expression levels and/or c) lower accumulation of the recombinant protein at intracellular level.

Despite the linear and conformational antigenic epitopes are mainly located on the amino acid residue 47–85, 165–200 and 230–233 of Cap protein (Lekcharoensuk et al., 2004; Mahe et al., 2000), an epitope located on residues 26–36 of NLS was recently recognized (Guo et al., 2010). So, the lacking of NLS on Cap could result in fewer antibody recognition sites, leading to the weaker staining observed on IPMA.

Another possibility is that Bac.SP.ΔSNL.Cap could have induced lower levels of the protein expression. In this case an effect of signal peptide on the protein expression is unlikely, since no decrease in staining was observed in Bac.SP.Cap, the other recombinant virus containing the BoHV-gI signal peptide sequence.

In general, the signal peptides induce protein in a secretory pathway, where the protein is synthesized on endoplasmic reticulum, migrates to Golgi complex and then crosses the cytoplasmic membrane as a secretory vesicle (Martoglio and Dobbstein, 1998). In this work, one putative signal peptide was identified in BoHV-gI, but none in PCV2 Cap protein. The putative BoHV-gI signal peptide inserted on Cap protein might lead it to a secretory pathway. However, if the protein has also a NLS, then it also could target the nucleus (Antoine et al., 1997; Dultz et al., 2008; Miguel et al., 2001; Ou et al., 1989). Other study observed that the intra and extracellular protein levels was decreased and increased, respectively, when the SNL was deleted from the Parathyroid hormone related peptide (PTHrP), a protein that has a signal peptide (Miguel et al., 2001). So, another possible explanation is that the recombinant protein produced by Bac.SP.ΔSNL.Cap was secreted in a higher proportion when compared with the others recombinants, resulting in lower intracellular accumulation and, therefore, to the weaker staining observed.

Furthermore, the constructed recombinants were based on genome sequence of a PCV2b strain. Epidemiological studies indicate that genotype PCV2b is currently most prevalent in naturally occurring infections (Allan et al., 2007; Chiarelli-Neto et al., 2009; Cortey et al., 2010; Dupont et al., 2008; Takahagi et al., 2008; Timmusk et al., 2008) and it has been suggested as more virulent than PCV2a (Gagnon et al., 2007; Grau-Roma et al., 2008). Currently, commercially available PCV2 vaccines are all based on PCV2a, despite they protect against genotypes PCV2a and PCV2b (Fort et al., 2008; Takahagi et al., 2008), a recent study showed that PCV2b has induced significantly

higher antibody titres and lymphoproliferative responses than PCV2a strain (Fort et al., 2010). So, it is likely that a PCV2b-based vaccine could elicit stronger immune responses than a PCV2a-based vaccine. In this sense, the here generated recombinants are potential vaccine candidates, once they were PCV2b-based.

Acknowledgements

The authors would like to thank the collaborators of the Virology Laboratories of UFRGS and Fepagro Animal Health (IPVDF). Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). DD was in receipt of a Doctor's grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). PMR is a CNPq 1B research fellow. To FAMR, in memoriam.

References

- Alken, M., Rutz, C., Kochl, R., Donalies, U., Oueslati, M., Furkert, J., Wietfeld, D., Hermosilla, R., Scholz, A., Beyermann, M., Rosenthal, W., Schulein, R., 2005, The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J* 390, 455-464.
- Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A., Charreyre, C., 1998, Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142, 467-468.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121, 1-11.
- Allan, G.M., McNeilly, F., McMenamy, M., McNair, I., Krakowka, S.G., Timmusk, S., Walls, D., Donnelly, M., Minahin, D., Ellis, J., Wallgren, P., Fossum, C., 2007, Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest* 19, 668-673.
- Antoine, M., Reimers, K., Dickson, C., Kiefer, P., 1997, Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem* 272, 29475-29481.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A., 2003, Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21, 4565-4575.

- Chae, C., 2005, A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169, 326-336.
- Cheung, A.K., Bolin, S.R., 2002, Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol* 147, 43-58.
- Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S., Vidigal, P.M., Silva, F.M., Castro, L.A., Fietto, J.L., Silva, A., Jr., Almeida, M.R., 2009, Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Res* 140, 57-63.
- Cortey, M., Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J., Segales, J., 2010, Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J*.
- Dezen, D., Rijsewijk, F.A., Teixeira, T.F., Holz, C.L., Cibulski, S.P., Franco, A.C., Dellagostin, O.A., Roehe, P.M., 2010, Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res Vet Sci* 88, 436-440.
- Dultz, E., Hildenbeutel, M., Martoglio, M., Hochman, J., Dobberstein, B., Kapp, K., 2008, The Signal Peptide of the Mouse Mammary Tumor Virus Rem Protein Is Released from the Endoplasmic Reticulum Membrane and Accumulates in Nucleoli. *J Biol Chem* 283, 9966-9976.
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008, Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128, 56-64.
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G.M., 2004, Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol* 98, 159-163.
- Esteves, P.A., Dellagostin, O.A., Pinto, L.S., Silva, A.D., Spilki, F.R., Ciacci-Zanella, J.R., Hubner, S.O., Puentes, R., Maisonnave, J., Franco, A.C., Rijsewijk, F.A., Batista, H.B., Teixeira, T.F., Dezen, D., Oliveira, A.P., David, C., Arns, C.W., Roehe, P.M., 2008, Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res* 131, 16-22.
- Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., Elbers, K., 2008, The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26, 1488-1499.
- Fan, H., Pan, Y., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S., 2008a, Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J Virol Methods* 150, 21-26.
- Fan, H., Xiao, S., Tong, T., Wang, S., Xie, L., Jiang, Y., Chen, H., Fang, L., 2008b, Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments. *Mol Immunol* 45, 653-660.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004, A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol* 78, 6297-6303.
- Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segales, J., 2008, Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063-1071.

- Guan, X.M., Kobilka, T.S., Kobilka, B.K., 1992, Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J Biol Chem* 267, 21995-21998.
- Guo, L., Lu, Y., Huang, L., Wei, Y., Liu, C., 2010, Identification of a New Antigen Epitope in the Nuclear Localization Signal Region of Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein. *Intervirology* 54, 156-163.
- Harding, J., 1998, Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod* 6, 249-254.
- Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B., Chen, H., 2005, Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 109, 179-190.
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Botner, A., 2004, Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22, 1358-1361.
- King, L.A., Hitchman, R., Possee, R.D., 2007, Recombinant Baculovirus Isolation, In: Murhammer, D.W. (Ed.) *Baculovirus and insect cell expression protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 460.
- Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008, Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443-3451.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J., 2004, Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol* 78, 8135-8145.
- Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., 2001a, Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285, 91-99.
- Liu, Q., Willson, P., Attoh-Poku, S., Babiuk, L.A., 2001b, Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expr Purif* 21, 115-120.
- Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jestin, A., 2000, Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France. Clinical observations from followup studies on affected farms. *Livestock Production Science* 63, 223-233.
- Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000, Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81, 1815-1824.
- Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., 2004, Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98, 81-88.
- Martoglio, B., Dobbstein, B., 1998, Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* 8, 410-415.
- Miguel, F., Fiaschi-Taesch, N., López-Talavera, J.C., Takane, K.K., Massfelder, T., Helwig, J.-J., Stewart, A.F., 2001, The C-Terminal Region of PTHrP, in Addition to the Nuclear Localization Signal, Is Essential for the Intracrine Stimulation of Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 142, 4096-4105.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81, 2281-2287.

- Nunnari, J., Walter, P., 1992, Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 573–580.
- O'Reilly, D., Miller, L., Luckow, V., 1992, *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Freeman and Company, New York.
- Ou, J.H., Yeh, C.T., Yen, S.B., 1989, Transport of Hepatitis B Virus Precore Protein into the Nucleus after Cleavage of Its Signal Peptide. *J Virol* 63, 5238-5243.
- Petrovska, R., Kapa, I., Klovins, J., Schioth, H.B., Uhlen, S., 2005, Addition of a signal peptide sequence to the α 1D-adrenoceptor gene increases the density of receptors, as determined by [³H]-prazosin binding in the membranes. *British Journal of Pharmacology* 144, 651-659.
- Rapoport, T.A., 1992, Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258, 931–936.
- Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, L.G., Rosa, J.C.A., 1997, Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 17, 41–44.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001, *Molecular Cloning: a laboratory manual Vol 1*, 3rd Edition. Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanders, S.L., Schekman, R., 1992, Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 13791–13794.
- Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005, Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, 119-142.
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D., 1983, Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46, 584–593.
- Sorden, S.D., Harms, P.A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D., Paul, P.S., 1999, Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Vet Diagn Invest* 11, 528-530.
- Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F., Murakami, H., 2008, Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Vet Med Sci* 70, 603-606.
- Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Khouri, H.E., Laliberte, F., Vernet, T., 1991, Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98, 177-183.
- Timmusk, S., Wallgren, P., Brunborg, I.M., Wikstrom, F.H., Allan, G., Meehan, B., McMenamy, M., McNeilly, F., Fuxler, L., Belak, K., Podersoo, D., Saar, T., Berg, M., Fossum, C., 2008, Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes* 36, 509-520.
- Tyborowska, J., Bienkowska-Szewczyk, K., Rychlowski, M., Van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A.M., 2000, The extracellular part of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 is sufficient for complex formation with glycoprotein I but not for cell-to-cell spread. *Arch Virol* 145, 333-351.
- Wang, K., Huang, L., Kong, J., Zhang, X., 2008, Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *J Virol Methods* 150, 1-6.
- Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z., Xu, J., 2006, Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine* 24, 3374-3380.

Zhou, J.Y., Shang, S.B., Gong, H., Chen, Q.X., Wu, J.X., Shen, H.G., Chen, T.F., Guo, J.Q., 2005, In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J Biotechnol* 118, 201-211.

Table 1. Primers used for amplification of recombinant DNA fragments rf-Cap, rf-SP-Cap and rf-SP- Δ NLS-Cap. The *Bam*HI and *Hind*III sites are represented by underlined text. The homologous nucleotide sequence of PCV2 ORF2 (DQ923523) and BoHV-gI signal peptide (AJ004801) in the primers are in italic or bold, respectively.

Primer	Sequence (5'-3')	Holomologus region	
		PCV2	BoHV-1
P1	ctcc <u>ggatcc</u> gctcaaaatgacgtatccaaggagcgttac	1734-1711	-
P2	cgcgaa <u>gctt</u> cattaagggttaagtgggggtctttaag	1031- 1059	-
P3	ctcc <u>ggatcc</u> gctcaaaat cggtgcctgttgcctc tg	-	120287-120306
P4	ggtaacgcctccttgatacgta aggctcgagcggcg	1710-1731	120349-120333
P5	cgcccgctcgagcctt acgtatccaaggagcggttacc	1731-1710	120333-120349
P6	agaggcgggtgtgaagatgccatta aggctcgagcggcg	1587-1611	120349-120333
P7	cgcccgctcgagcctt aatggcatcttcaacaccgcctct	1611-1587	120333-120349

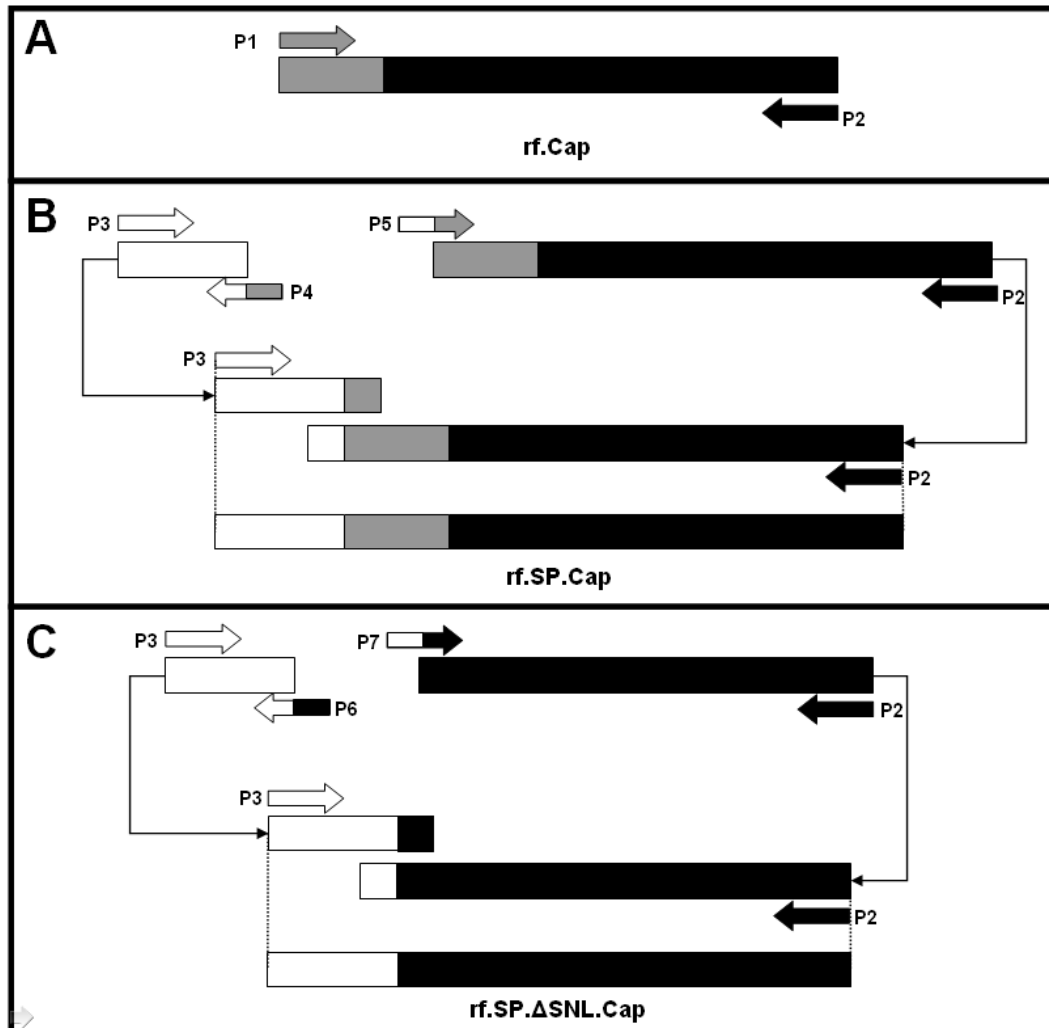


Fig. 1. Strategy for amplification of recombinant DNA fragments. The black, grey and white boxes represent nucleotide sequence of PCV2 ORF2, NLS of ORF2 and BoHV-gI signal peptide, respectively. P1 to P7 represents the primers described on table 1. The rf.Cap was amplified with P1/P2 primers (A). The PCR products obtained with primers P3/P4 and P2/P5 were fused with primers P2/P3 to generate the rf.SP.Cap (B), the similar strategy was applied to generate the rf.SP.ΔNLS.Cap (C), except for primers P4 and P5 that were replaced for P6 and P7, respectively.

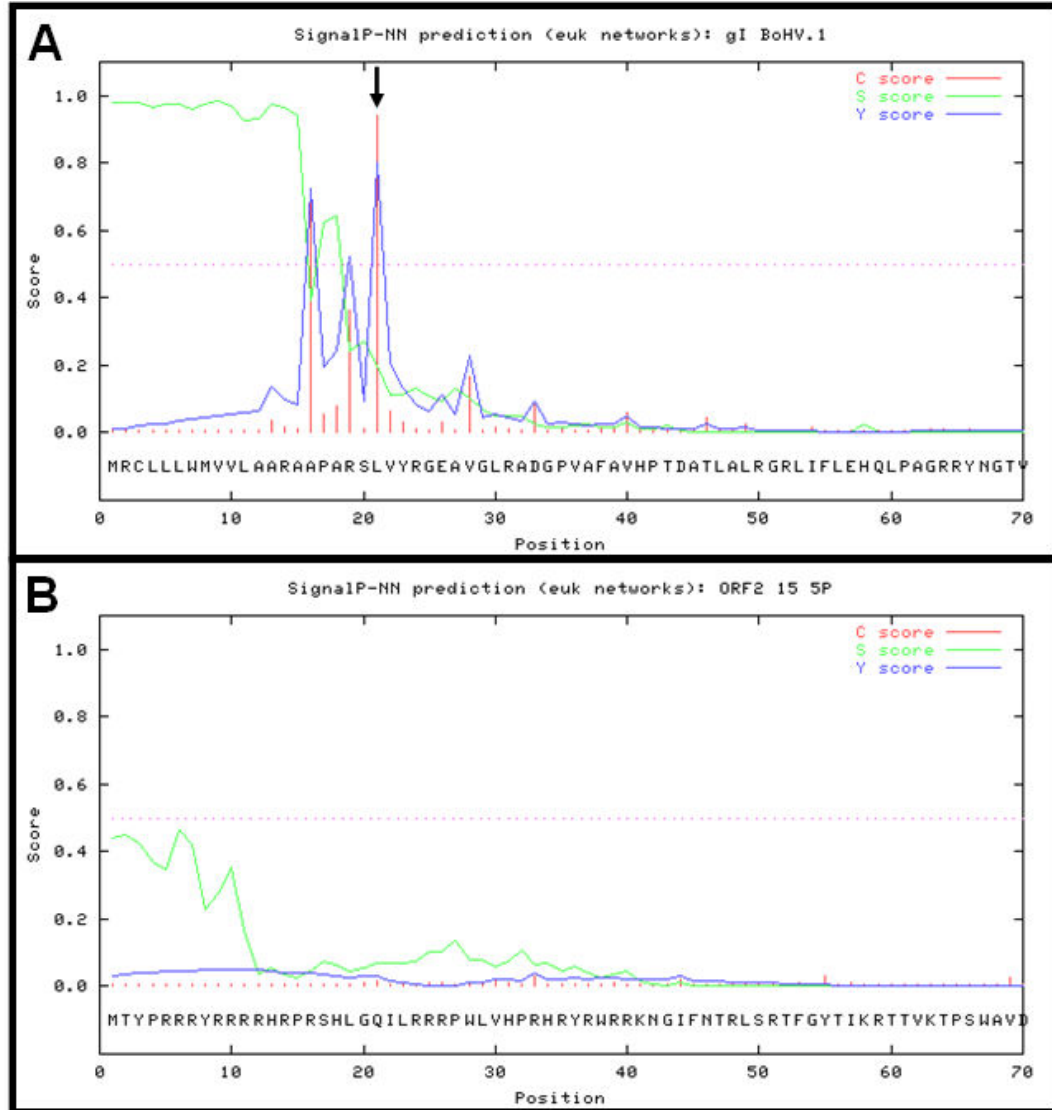


Fig. 2. Signal peptide prediction by SignalP 3.0 Neural Networks (Signal IP-NN) using the deduced amino acid sequences of BoHV-gI (A) and PCV2 Cap protein (B). “S score” corresponds to aminoacid probability to compose the signal peptide and the “C score” represents the probability to occur a peptide cleavage. The maximum probability cleavage site of gI of BoHV-1 was found between Ser20 and Leu21 (arrow).

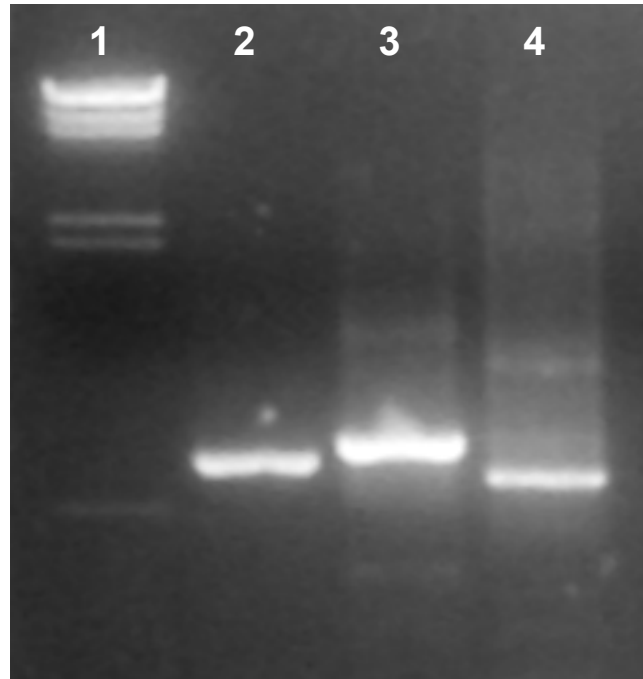


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the recombinant DNA fragments generated on PCR. Lines 1-4 correspond to molecular markers (λ *Hind*III), rf.Cap (702 bp), rf.SP.Cap (764 bp) and rf.SP. Δ NLS.ORF2 (642 bp), respectively.

```

SP BoHV gI      MRCLLLWMVV LAARAAAPARS L-----
PCV2 Cap protein ----- MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYWRR KNGIFNTRLS
Bac.Cap        ----- MTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYWRR KNGIFNTRLS
Bac.SP.Cap     MRCLLLWMVV LAARAAAPARS LTYPRRRYRR RRHRPRSHLG QILRRRPWLV HPRHRYWRR KNGIFNTRLS
Bac.SP.ΔNLS.Cap MRCLLLWMVV LAARAAAPARS L----- -NGIFNTRLS

SP BoHV gI      -----
PCV2 Cap protein RTFGYTIKRT TVKTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
Bac.Cap         RTFGYTIKRT TVKTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
Bac.SP.Cap      RTFGYTIKRT TVKTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS
Bac.SP.ΔNLS.Cap RTFGYTIKRT TVKTPSWAVD MMRFNINDFL PPGGGSNPRS VPFEYYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDRGVGS

SP BoHV gI      -----
PCV2 Cap protein SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR NQLWLRQLTT
Bac.Cap         SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR NQLWLRQLTT
Bac.SP.Cap      SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR NQLWLRQLTT
Bac.SP.ΔNLS.Cap SAVILDDNFV TKATALTYDP YVNYSSRHTI TQPFYSHSRY FTPKPVLDST IDYFQPNNKR NQLWLRQLTT

SP BoHV gI      -----
PCV2 Cap protein GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDDP LNP*
Bac.Cap         GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDDP LNP*
Bac.SP.Cap      GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDDP LNP*
Bac.SP.ΔNLS.Cap GNVDHVGLGT AFENSIYDQE YNIRVTMYVQ FREFNLKDDP LNP*

```

Fig. 4. Amino acid sequence alignment using the sequences from the cloned recombinant DNA fragments, PCV2 Cap protein (DQ923523) and the BoHV-gI signal peptide (AJ004801). Signal peptide and NLS are represented as underlined and bold text, respectively.

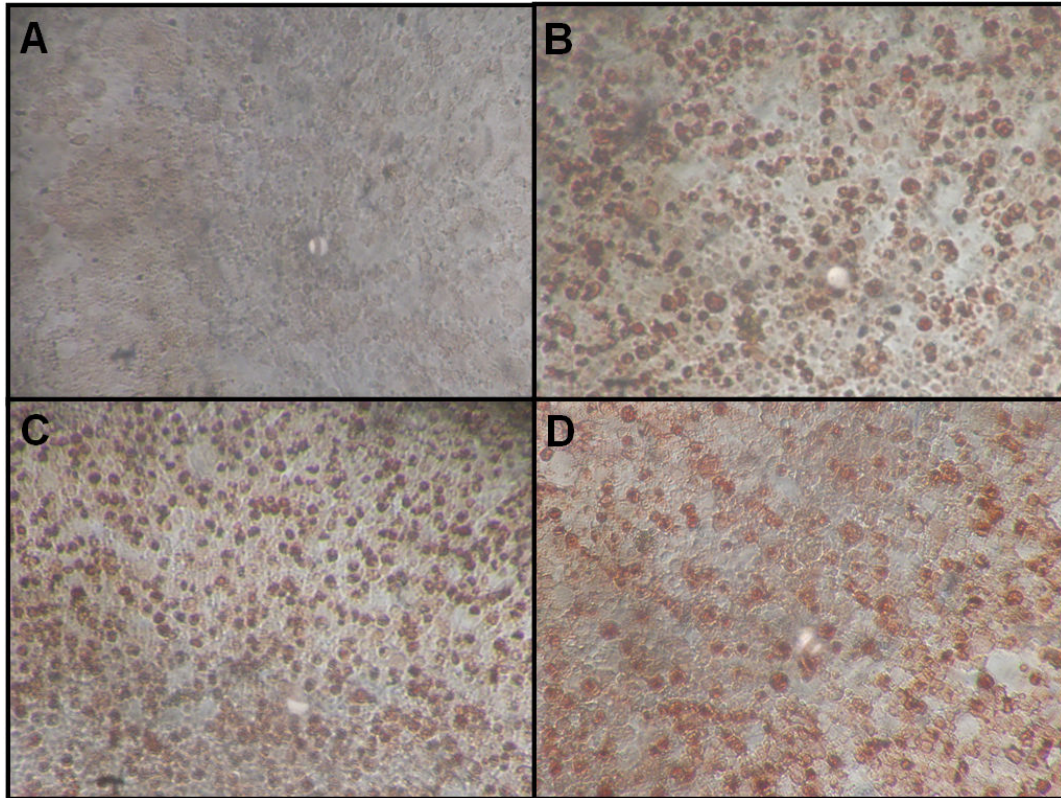


Fig. 5. Immunoperoxidase monolayer assay with anti-PCV2-Cap polyclonal serum as primary antibody. *Sf21* cells were infected with infected wild type AcNPV(A), Bac.Cap (B), Bac.SP.Cap (C) and Bac.SP.ΔNSL.Cap (D). The reddish-brown coloration indicates PCV2 antigens.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados aspectos relacionados à avaliação de métodos de detecção do PCV2 e desenvolvimento de potenciais imunógenos contra a circovirose.

No primeiro estudo a técnica de amplificação por círculo rolante (ACR) foi utilizada. Neste obteve-se a amplificação total do genoma do PCV2, o qual foi clonado e posteriormente sequenciado. Os resultados da análise filogenética agruparam as duas amostras sequenciadas (15/5 e 15/23) no genótipo PCV2b, de acordo com o sistema de classificação proposto por Segalés et al. (2008). Estes achados reforçam, dados de estudos epidemiológicos que indicam que o genótipo PCV2b é atualmente o mais prevalente em suínos naturalmente infectados (ALLAN et al., 2007, DUPONT et al., 2008, TAKAHAGI et al., 2008, TIMMUSK et al., 2008, CHIARELLI-NETO et al., 2009, CIACCI-ZANELLA et al., 2009a, CORTEY et al., 2010).

A amplificação do genoma do PCV2 através da ACR, associada à técnica de clonagem e transfecção, permitiu obter títulos de até $10^{5.5}$ DICC_{50/mL} do vírus. Visto que a propagação de PCV2 em cultivo celular pode ser demorada e raramente dá origem a títulos infecciosos $\geq 10^{5.0}$ DICC_{50/mL} (ZHU et al., 2007), a abordagem utilizada pode ser utilizada como um método alternativo para o isolamento e propagação do vírus. Sendo particularmente útil quando não se consegue recuperar o agente infeccioso através de métodos convencionais, tal como o isolamento viral.

Uma desvantagem observada na técnica de ACR foi sua menor sensibilidade em relação à técnica de PCR. Das 50 amostras de tecidos analisadas, em todas foi possível detectar DNA de PCV2 através de PCR, enquanto que apenas 54% das amostras foram positivas na ACR. Apesar da ACR ser relatada como uma técnica altamente eficiente, produzindo cerca de 20-30 μ g de produto a partir de 1-10 cópias de DNA genômico humano (DEAN et al., 2002), é possível que a baixa sensibilidade evidenciada neste estudo possa ser resultado da competição de DNA genômico e viral por primers e dNTPs. Uma vez que a ACR baseia-se na amplificação aleatória e a quantidade de DNA viral é menos abundante do que o DNA genômico nas amostras analisadas, é provável que o primeiro seja amplificado em menor proporção.

Todavia, a ACR apresenta vantagens adicionais sobre a PCR convencional (DEAN et al., 2001). A técnica não requer o uso de termocicladores para amplificação e nenhum outro equipamento além de um banho-maria ou estufa a 30 ° C é necessário, o

que torna o processo econômico. Além disso, a ACR é realizada em uma única etapa e permite a amplificação do DNA viral sem conhecimento prévio da sequência alvo.

No segundo estudo, foram desenvolvidos e comparados métodos quantitativos de detecção de DNA do PCV2, como técnicas auxiliares no diagnóstico da SMDS. Neste, observou-se que ambos os métodos foram capazes de detectar diferenças significativas da carga viral ($\geq 2,5 \log_{10}$) entre animais com a síndrome e animais clinicamente saudáveis. No entanto, as quantidades de DNA de PCV2 detectadas pela cPCR foram em média $1,8 \log_{10}$ inferior às detectadas na PCR em tempo real. Estudos relatam que três a seis erros no pareamento de oligonucleotídeos com a sequência alvo alteraram o desempenho de amplificação, podendo resultar numa subestimação de $1-5 \log_{10}$ (MARKOWSKI-GRIMSRUD et al., 2002, BRUNBORG et al., 2004). Portanto, a diferença da carga viral observada entre os ensaios aqui descritos, pode ter sido causada por erros de pareamento. Haja vista, que quando comparados com sequências genômicas do PCV2, os oligonucleotídeos utilizados na cPCR apresentaram menor grau de conservação em relação aos da PCR em tempo-real.

Outra possibilidade para a diferença observada é a presença de contaminantes nas amostras. É possível que alguns contaminantes tenham afetado mais significativamente a amplificação na cPCR do que na PCR em tempo-real. Porém esta hipótese parece improvável, uma vez que a amplificação do DNA competidor não foi afetada.

Neste estudo, a maior carga viral detectada no grupo de animais clinicamente saudáveis foi de $10^{3,3}$ e $10^{5,7}$ cópias de DNA de PCV2/ 500 ng, para a cPCR e o PCR em tempo real, respectivamente. Estes dados apontam diferentes limites detectados para o aparecimento da síndrome. Tem sido proposto o limite de 10^7 cópias de DNA de PCV2 por ml de soro ou 500 ng de DNA da amostra, como sendo sugestivo da SMDS (BRUNBORG et al., 2004). No entanto, um estudo comparando dois PCR em tempo real rotineiramente utilizados encontrou um viés de $1,4 \log_{10}$ entre os ensaios, sugerindo que o estabelecimento deste limite deva ser determinado para cada ensaio em particular (HJULSAGER et al., 2009).

Outros autores observaram que a carga viral de PCV2, por grama de tecido ou ml de soro, foi em média $3 \log_{10}$ superiores em animais com a síndrome do que em animais clinicamente saudáveis. Portanto, uma abordagem para avaliar as técnicas seria considerar a diferença das cargas virais entre grupos. Usando esse critério, os ensaios

aqui descritos permitem o diagnóstico adequado, uma vez que a diferenças entre grupos foi de no mínimo $2,5 \log_{10}/100 \text{ ng}$ de amostra de DNA (ou $3,2 \log/500\text{ng}$).

Com relação à decisão sobre qual dos dois ensaios seriam mais adequados para apoiar o diagnóstico da síndrome, a PCR em tempo real apresenta uma série de vantagens práticas em comparação com a cPCR, tais como: é menos propensa a falsos positivos, uma vez que diminui o risco de contaminação, como a manipulação pós-amplificação; demanda um menor tempo para realização, uma vez que nenhum DNA competidor necessita ser construído; não requer múltiplas diluições e eletroforese (ZENTILIN e GIACCA, 2010). Além disso, neste estudo a PCR em tempo real detectou uma carga viral mais elevada do que a cPCR, indicando uma maior eficiência na amplificação do DNA alvo, o que pode ser atribuído em parte ao uso de oligonucleotídeos com seqüências mais conservadas em relação ao DNA de PCV2.

No terceiro trabalho foram construídos três baculovírus recombinantes, Bac.Cap, Bac.SP.Cap e Bac.SP. Δ NLS.Cap. Os recombinantes foram construídos de modo a expressar a proteína do capsídeo do PCV2 (Cap). Em dois recombinantes, a seqüência de nucleotídeos do peptídeo sinal da glicoproteína I do herpesvírus bovino (BoHV-gI) foi inserida na extremidade 5' da ORF2, gene codificante da proteína Cap. Adicionalmente, em um dos recombinantes contendo o peptídeo sinal, o sinal de localização nuclear (SLN) da Cap foi excluído.

Neste experimento, foi possível detectar a presença de antígenos virais de PCV2 nas células infectadas pelos três diferentes recombinantes. No entanto, uma coloração menos intensa em células infectadas pelo Bac.SP. Δ NLS.Cap foi observada na IPMA. Uma vez que, a intensidade do sinal detectado na IPMA se correlaciona com a quantidade de antígeno presente na amostra, a coloração menos intensa observada em células infectadas pelo Bac.SP. Δ NLS.Cap pode ter sido causada por:

a) menor nível de expressão da proteína recombinante: neste caso, um efeito do peptídeo sinal na expressão de proteínas é improvável, pois não foi observada redução na coloração em células infectadas com Bac.SP.Cap, o qual também continha um peptídeo sinal.

b) perda de epitopos: A deleção do SLN da Cap poderia ter resultado em uma perda de epitopos. Apesar de epitopos lineares e conformacionais estarem localizados principalmente sobre nos resíduos de aminoácidos 47-85, 165-200 e 230-233 da proteína Cap (MAHE et al., 2000, LEKCHAROENSUK et al., 2004), um epítipo localizado nos resíduos 26-36 do SLN foi recentemente descrito (GUO et al., 2010). Portanto, a

supressão do SLN poderia resultar em um menor número de sítios de ligações para os anticorpos reagirem com a proteína recombinante, resultando assim na coloração menos intensa detectada na IPMA.

c) e/ou a proteína recombinante produzida é secretada em grande proporção, o que faz com que ela se acumule em menos no núcleo ou citoplasma das células. É sabido que peptídeo sinais induzem a proteína para uma via secretória, onde a proteína é sintetizada no retículo endoplasmático, migra para o complexo de Golgi e, em seguida, atravessa a membrana citoplasmática como uma vesícula secretora (MARTOGLIO e DOBBESTEIN, 1998).

Todavia, na outra construção contendo o peptídeo sinal (Bac.SP.Cap) não foi observada uma diminuição na coloração na IPMA. Isto pode ser devido ao fato que algumas proteínas que contêm peptídeo sinal e SLN podem seguir duas vias, serem secretadas ou ser direcionada para o núcleo (OU et al., 1989, ANTOINE et al., 1997, MIGUEL et al., 2001, DULTZ et al., 2008) . Quando o SNL foi deletado do “peptídeo relacionado ao paratormônio” (PTHrP), uma proteína que tem um peptídeo sinal, observou-se uma diminuição intracelular e um aumento extracelular da concentração da proteína recombinante (MIGUEL et al., 2001). É provável que esta seja a mesma situação da proteína recombinante produzida pelo Bac.PS.ΔSNL.Cap. Todavia, estas são apenas especulações necessitando de outros testes confirmatórios como Western Blot para a comprovação das pressuposições acima descritas.

Além disso, os recombinantes construídos foram baseados em genótipo PCV2b. Estudos epidemiológicos indicam que o genótipo PCV2b é atualmente o mais prevalente em infecções naturais (ALLAN et al., 2007, CHIARELLI-NETO et al., 2009, CORTEY et al., 2010) e tem sido sugerido como mais virulento do que PCV2a (GAGNON et al., 2007, GRAU-ROMA et al., 2008). Atualmente, todas as vacinas comerciais contra circovirose são baseadas no genótipo de PCV2a. Apesar das mesmas conferirem proteção contra ambos genótipos, PCV2a e PCV2b (FORT et al., 2008), um estudo recentemente revelou que um isolado de PCV2b induziu maiores títulos de anticorpos e respostas linfoproliferativas que um isolado de PCV2a (FORT et al., 2010). Nesse sentido, os recombinantes aqui gerados são potenciais candidatos vacinais, uma vez que foram baseados no genótipo PCV2b.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, G.M.; MACKIE, D.P.; MCNAIR, J.; ADAIR, B.M.; MCNULTY, M.S. Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 43, p. 357-71. 1994a.
- ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; MCNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 41, p. 17-26. 1994b.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; CASSIDY, J.P.; REILLY, G.A.; ADAIR, B.; ELLIS, W.A.; MCNULTY, M.S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Vet Microbiol**, v. 44, p. 49-64. 1995.
- ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **J Comp Pathol**, v. 121, p. 1-11. 1999a.
- ALLAN, G.M.; MC NEILLY, F.; MEEHAN, B.M.; KENNEDY, S.; MACKIE, D.P.; ELLIS, J.A.; CLARK, E.G.; ESPUNA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C.E. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. **Vet Microbiol**, v. 66, p. 115-23. 1999b.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **J Vet Diagn Invest**, v. 12, p. 3-14. 2000.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B.; MCNAIR, I.; WALKER, I.; KENNEDY, S. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. **Arch Virol**, v. 145, p. 2421-9. 2000a.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; CURRAN, M.D.; WALKER, I.; ELLIS, J.; KONOBY, C.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. **Arch Virol**, v. 145, p. 853-7. 2000b.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MCMENAMY, M.; MCNAIR, I.; KRAKOWKA, S.G.; TIMMUSK, S.; WALLS, D.; DONNELLY, M.; MINAHIN, D.; ELLIS, J.; WALLGREN, P.; FOSSUM, C. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, p. 668-73. 2007.

- ANTOINE, M.; REIMERS, K.; DICKSON, C.; KIEFER, P. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. **J Biol Chem**, v. 272, p. 29475-29481. 1997.
- ASANOME, W.; KOLLER, F.L.; NOTTAR, E.; CARREGARO, F.B.; CORRÊA, A.; ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Associação entre otites bacterianas e infecção pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em suínos1. **Pesquisa Vet Bras**, v. 28, p. 471-476. 2008.
- BALASCH, M.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **J Comp Pathol**, v. 121, p. 139-48. 1999.
- BARSOUM, J.; BROWN, R.; MCKEE, M.; BOYCE, F.M. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. **Hum Gene Ther**, v. 8, p. 2011-8. 1997.
- BLANCHARD, P.; MAHE, D.; CARIOLET, R.; KERANFLECH, A.; BAUDOUDARD, M.A.; CORDIOLI, P.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. **Vaccine**, v. 21, p. 4565-75. 2003.
- BOLIN, S.R.; STOFFREGEN, W.C.; NAYAR, G.P.; HAMEL, A.L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. **J Vet Diagn Invest**, v. 13, p. 185-94. 2001.
- BRUNBORG, I.M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C.M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **J Virol Methods**, v. 122, p. 171-8. 2004.
- CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J.; QUINTANA, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 1848-50. 2002.
- CARMAN, S.; MCEWEN, B.; DELAY, J.; VAN DREUMEL, T.; LUSIS, P.; CAI, H.; FAIRLES, J. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). **Can Vet J**, v. 47, p. 761-2. 2006.
- CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **Vet J**, v. 168, p. 41-9. 2004.
- CHAIYAKUL, M.; HSU, K.; DARDARI, R.; MARSHALL, F.; CZUB, M. Cytotoxicity of ORF3 proteins from a nonpathogenic and a pathogenic porcine circovirus. **J Virol**, v. 84, p. 11440-7. 2010.

- CHANG, H.W.; JENG, C.R.; LIU, J.J.; LIN, T.L.; CHANG, C.C.; CHIA, M.Y.; TSAI, Y.C.; PANG, V.F. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. **Vet Microbiol**, v. 108, p. 167-77. 2005.
- CHANG, H.W.; PANG, V.F.; CHEN, L.J.; CHIA, M.Y.; TSAI, Y.C.; JENG, C.R. Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. **Vet Microbiol**, v. 115, p. 311-9. 2006.
- CHEUNG, A.K.; BOLIN, S.R. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. **Arch Virol**, v. 147, p. 43-58. 2002.
- CHEUNG, A.K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 313, p. 452-9. 2003a.
- CHEUNG, A.K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 305, p. 168-80. 2003b.
- CHEUNG, A.K.; LAGER, K.M.; KOHUTYUK, O.I.; VINCENT, A.L.; HENRY, S.C.; BAKER, R.B.; ROWLAND, R.R.; DUNHAM, A.G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Arch Virol**, v. 152, p. 1035-44. 2007.
- CHEUNG, A.K. Homologous recombination within the capsid gene of porcine circovirus type 2 subgroup viruses via natural co-infection. **Arch Virol**, v. 154, p. 531-4. 2009.
- CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K.S.; VIDIGAL, P.M.; SILVA, F.M.; CASTRO, L.A.; FIETTO, J.L.; SILVA, A., JR.; ALMEIDA, M.R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Virus Res**, v. 140, p. 57-63. 2009.
- CHOI, C.; CHAE, C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. **J Comp Pathol**, v. 123, p. 302-5. 2000.
- CHOI, C.; CHAE, C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. **Vet Pathol**, v. 38, p. 436-41. 2001.
- CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnóstico da síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) no Brasil pelo circovírus suíno tipo 2. **Comunicado Técnico - Embrapa Suínos e Aves**, v., p. 1-3. 2001.
- CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1998 in Brazil. **Ciência Rural**, v. 26, p. 1480-1485. 2006.

- CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L.T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; ESTEVES, P.A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. **Research in Veterinary Science**, v. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.001, p. In Press. 2009a.
- CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L.T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; ESTEVES, P.A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. **Res Vet Sci**, v. 87, p. 157-60. 2009b.
- CLARK, E. Postweaning multisystemic wasting syndrome. *In: Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners* p. 499-501 1997
- CORRÊA, A.M.R.; PESCADOR, C.A.; SCHIMITZ, M.; ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D.B.; OLIVEIRA, E.C.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Vet Bras**, v. 26, p. 9-13. 2006.
- CORRÊA, A.M.R.; ZLOTOWSKI, P.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Gastric ulcers in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Pesquisa Vet Bras**, v. 28, p. 601-605. 2008.
- CORTEY, M.; PILERI, E.; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; BALASCH, M.; PLANA, J.; SEGALÉS, J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. **Vet J**, v., p. 2010.
- COTTRELL, T.S. A study investigation epidemiological risk factors for porcine circovirus type 2 in Ontario. **Pig J**, v. 44, p. 10-17. 1999.
- CROWTHER, R.A.; BERRIMAN, J.A.; CURRAN, W.L.; ALLAN, G.M.; TODD, D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. **J Virol**, v. 77, p. 13036-41. 2003.
- CSÁGOLA, A.; CADAR, D.; TUBOLY, T. Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. **Acta Vet Hung**, v. 56, p. 421-7. 2008.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, p. 236-42. 2002.
- DARWICH, L.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. **J Gen Virol**, v. 84, p. 3453-7. 2003a.

- DARWICH, L.; PIE, S.; ROVIRA, A.; SEGALES, J.; DOMINGO, M.; OSWALD, I.P.; MATEU, E. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Gen Virol**, v. 84, p. 2117-25. 2003b.
- DARWICH, L.; SEGALES, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. **Arch Virol**, v. 149, p. 857-74. 2004.
- DAVIDSON, I.; SILVA, R.F. Creation of diversity in the animal virus world by inter-species and intra-species recombinations: lessons learned from poultry viruses. **Virus Genes**, v. 36, p. 1-9. 2008.
- DE BOISSESON, C.; BEVEN, V.; BIGARRE, L.; THIERY, R.; ROSE, N.; EVENO, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **J Gen Virol**, v. 85, p. 293-304. 2004.
- DEAN, F.B.; NELSON, J.R.; GIESLER, T.L.; LASKEN, R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Genome Res**, v. 11, p. 1095-9. 2001.
- DEAN, F.B.; HOSONO, S.; FANG, L.; WU, X.; FARUQI, A.F.; BRAY-WARD, P.; SUN, Z.; ZONG, Q.; DU, Y.; DU, J.; DRISCOLL, M.; SONG, W.; KINGSMORE, S.F.; EGHOLM, M.; LASKEN, R.S. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 5261-6. 2002.
- DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503-8. 2000.
- DULAC, G.C.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Can J Vet Res**, v. 53, p. 431-3. 1989.
- DULTZ, E.; HILDENBEUTEL, M.; MARTOGLIO, M.; HOCHMAN, J.; DOBBERSTEIN, B.; KAPP, K. The Signal Peptide of the Mouse Mammary Tumor Virus Rem Protein Is Released from the Endoplasmic Reticulum Membrane and Accumulates in Nucleoli. **J Biol Chem**, v. 283, p. 9966-9976. 2008.
- DUPONT, K.; NIELSEN, E.O.; BAEKBO, P.; LARSEN, L.E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Vet Microbiol**, v. 128, p. 56-64. 2008.
- EDWARDS, S.; SANDS, J.J. Evidence of circovirus infection in British pigs. **Vet Rec**, v. 134, p. 680-1. 1994.
- ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of

lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **J Vet Diagn Invest**, v. 11, p. 3-14. 1999.

ELLIS, J.; SPINATO, M.; YONG, C.; WEST, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. **J Vet Diagn Invest**, v. 15, p. 364-8. 2003.

ELLIS, J.A.; BRATANICH, A.; CLARK, E.G.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; HAINES, D.M.; HARDING, J.; WEST, K.H.; KRAKOWKA, S.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Vet Diagn Invest**, v. 12, p. 21-7. 2000.

ELLIS, J.A.; KONOBY, C.; WEST, K.H.; ALLAN, G.M.; KRAKOWKA, S.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; WALKER, I. Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. **Can Vet J**, v. 42, p. 461-4. 2001.

FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S.B.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. **Vaccine**, v. 26, p. 1488-99. 2008.

FAN, H.; PAN, Y.; FANG, L.; WANG, D.; WANG, S.; JIANG, Y.; CHEN, H.; XIAO, S. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. **J Virol Methods**, v. 150, p. 21-6. 2008a.

FAN, H.; XIAO, S.; TONG, T.; WANG, S.; XIE, L.; JIANG, Y.; CHEN, H.; FANG, L. Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments. **Mol Immunol**, v. 45, p. 653-60. 2008b.

FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; GILL, M.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 2494-503. 2000.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. **J Virol**, v. 77, p. 11232-43. 2003.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. **J Virol**, v. 78, p. 6297-303. 2004.

- FINLAISON, D.; KIRKLAND, P.; LUONG, R.; ROSS, A. Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. **Aust Vet J**, v. 85, p. 304-10. 2007.
- FITZGERALD-BOCARSLY, P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. **Biotechniques**, v. Suppl, p. 16-20, 22, 24-9. 2002.
- FORT, M.; SIBILA, M.; ALLEPUZ, A.; MATEU, E.; ROERINK, F.; SEGALES, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. **Vaccine**, v. 26, p. 1063-71. 2008.
- FORT, M.; SIBILA, M.; NOFRARIAS, M.; PEREZ-MARTIN, E.; OLVERA, A.; MATEU, E.; SEGALES, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 137, p. 226-34. 2010.
- FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.E.; MORES, N.; ZANELLA, J.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (Síndrome do Definhamento Multissistêmico de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Vet Bras**, v. 25, p. 39-53. 2005.
- GAGNON, C.A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P.; VENNE, M.H.; HOUDE, A.; ELAHI, S.M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **Can Vet J**, v. 48, p. 811-9. 2007.
- GILPIN, D.F.; MCCULLOUGH, K.; MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; STEVENSON, L.S.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 94, p. 149-61. 2003.
- GRAU-ROMA, L.; SEGALES, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. **Vet Microbiol**, v. 119, p. 144-51. 2007.
- GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALES, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Vet Microbiol**, v. 128, p. 23-35. 2008.
- GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALES, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **Vet J**, v., p. 2010.
- GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; SANDVIK, T.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; DREW, T.W.; BANKS, M. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. **Arch Virol**, v. 149, p. 1171-83. 2004.

- GUO, L.; LU, Y.; HUANG, L.; WEI, Y.; LIU, C. Identification of a New Antigen Epitope in the Nuclear Localization Signal Region of Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein. **Intervirology**, v. 54, p. 156-163. 2010.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cell Mol Life Sci**, v. 56, p. 313-29. 1999.
- HA, Y.; LEE, Y.H.; AHN, K.K.; KIM, B.; CHAE, C. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. **Vet Pathol**, v. 45, p. 842-8. 2008.
- HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J Virol**, v. 72, p. 5262-7. 1998.
- HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G.P. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. **Can J Vet Res**, v. 64, p. 44-52. 2000.
- HARDING, J. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *In: Proceedings of the Western Canadian Association of Swine Practitioners* p. 21 1996
- HARDING, J.C.S.; CLARK, E.G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J Swine Health Prod**, v. 5, p. 201-3. 1997.
- HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.R.; LAGER, K.M.; MOROZOV, I.; PAUL, P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet Pathol**, v. 38, p. 528-39. 2001.
- HASSLUNG, F.C.; BERG, M.; ALLAN, G.M.; MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; FOSSUM, C. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs. **J Gen Virol**, v. 84, p. 2937-45. 2003.
- HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p. 740-5. 2000.
- HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R.R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. **Virus Res**, v. 132, p. 201-7. 2008.
- HJULSAGER, C.K.; GRAU-ROMA, L.; SIBILA, M.; ENOE, C.; LARSEN, L.; SEGALÉS, J. Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. **Vet Microbiol**, v. 133, p. 172-8. 2009.

- JOHNSON, C.S.; JOO, H.S.; DIREKSIN, K.; YOON, K.J.; CHOI, Y.K. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, p. 507-12. 2002.
- JORSAL, S.E.; BILLE-HANSEN, V.; VIGRE, H.; LARSEN, P.B.; BOTNER, A.; NIELSEN, E.O.; ENOE, C.; BAEKBO, P. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *In: Proceedings of 19th International Pig Veterinary Society Congress Copenhagen, Denmark* p. 270 2006
- JOSEPHSON, G.; CHARBONNEAU, G. Case report of reproductive problems in a new startup operation. **J Swine Health Prod**, v. 9, p. 258-9. 2001.
- JU, C.; FAN, H.; TAN, Y.; LIU, Z.; XI, X.; CAO, S.; WU, B.; CHEN, H. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Vet Microbiol**, v. 109, p. 179-90. 2005.
- JUHAN, N.M.; LEROITH, T.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. **Virus Res**, v. 147, p. 60-6. 2010.
- KAMSTRUP, S.; BARFOED, A.M.; FRIMANN, T.H.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; BOTNER, A. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. **Vaccine**, v. 22, p. 1358-61. 2004.
- KARUPPANNAN, A.K.; JONG, M.H.; LEE, S.H.; ZHU, Y.; SELVARAJ, M.; LAU, J.; JIA, Q.; KWANG, J. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. **Virology**, v. 383, p. 338-47. 2009.
- KENNEDY, S.; SEGALES, J.; ROVIRA, A.; SCHOLLES, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. **J Vet Diagn Invest**, v. 15, p. 151-6. 2003.
- KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. **J Virol Methods**, v. 92, p. 105-11. 2001.
- KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, v. 98, p. 25-31. 2001.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **J Comp Pathol**, v. 128, p. 52-9. 2003.

- KIM, J.; CHAE, C. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation. **J Comp Pathol**, v. 131, p. 121-6. 2004.
- KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Vet Rec**, v. 155, p. 489-92. 2004.
- KIM, J.; HA, Y.; CHAE, C. Potentiation of porcine circovirus 2-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus is associated with excessive production of tumor necrosis factor-alpha. **Vet Pathol**, v. 43, p. 718-25. 2006.
- KIM, T.; TOAN, N.T.; SEO, J.; JUNG, B.; LEE, J.; LEE, B. Bordetella bronchiseptica aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. **Vet Microbiol**, v. 138, p. 318-24. 2009.
- KIUPEL, M.; STEVENSON, G.W.; CHOI, J.; LATIMER, K.S.; KANITZ, C.L.; MITTAL, S.K. Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. **Vet Pathol**, v. 38, p. 74-82. 2001.
- KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. **Vaccine**, v. 26, p. 3443-51. 2008.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Vet Pathol**, v. 37, p. 254-63. 2000.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MCNEILLY, F.; RINGLER, S.; RINGS, D.M.; ALLAN, G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). **Vet Pathol**, v. 38, p. 31-42. 2001.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MCNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; MCCULLOUGH, K.; ALLAN, G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. **Viral Immunol**, v. 15, p. 567-82. 2002.
- KRIEG, A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 709-60. 2002.
- KRISTENSEN, C.S.; BILLE-HANSEN, V.; VIGRE, H.; BOTNER, A.; BAEKBO, P.; ENOE, C.; LARSEN, L. Transmission of PMWS between pen mates. *In: Proceedings of 19th International Pig Veterinary Congress* p. 162 2006
- KYRIAKIS, S.C.; SAOULIDIS, K.; LEKKAS, S.; MILIOTIS CH, C.; PAPOUTSIS, P.A.; KENNEDY, S. The effects of immuno-modulation on the clinical and

pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Comp Pathol**, v. 126, p. 38-46. 2002.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STORGAARD, T.; BOTNER, A.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. **Vet Rec**, v. 148, p. 759-60. 2001.

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

LAINSON, F.A.; AITCHISON, K.D.; DONACHIE, W.; THOMSON, J.R. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 588-93. 2002.

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

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 4629-32. 2000.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can J Vet Res**, v. 67, p. 114-20. 2003.

LEFEBVRE, D.J.; MEERTS, P.; COSTERS, S.; MISINZO, G.; BARBE, F.; VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H.J. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. **Vet Microbiol**, v., p. 2008.

LEFEBVRE, D.J.; VAN DOORSSELAERE, J.; DELPUTTE, P.L.; NAUWYNCK, H.J. Recombination of two porcine circovirus type 2 strains. **Arch Virol**, v. 154, p. 875-9. 2009.

LEKCHAROENSUK, P.; MOROZOV, I.; PAUL, P.S.; THANGTHUMNIYOM, N.; WAJJAWALKU, W.; MENG, X.J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. **J Virol**, v. 78, p. 8135-45. 2004.

LIPEJ, Z.; SEGALES, J.; JEMERSIC, L.; OLVERA, A.; ROIC, B.; NOVOSEL, D.; MIHALJEVIC, Z.; MANOJLOVIC, L. First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. **Acta Vet Hung**, v. 55, p. 389-404. 2007.

- LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **J Virol**, v. 79, p. 8262-74. 2005.
- LIU, J.; CHEN, I.; CHUA, H.; DU, Q.; KWANG, J. Inhibition of porcine circovirus type 2 replication in mice by RNA interference. **Virology**, v. 347, p. 422-33. 2006a.
- LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **J Virol**, v. 80, p. 5065-73. 2006b.
- LIU, Q.; TIKOO, S.K.; BABIUK, L.A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 285, p. 91-9. 2001.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from followup studies on affected farms. **Livest Prod Sci**, v. 63, p. 223-32. 2000.
- MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X.J.; OPRIESSNIG, T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, p. 830-4. 2009.
- MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **J Comp Pathol**, v. 123, p. 258-69. 2000.
- MAHE, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C.; ARNAULD, C.; LE CANN, P.; CARIOLET, R.; MADEC, F.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. **J Gen Virol**, v. 81, p. 1815-24. 2000.
- MALDONADO, J.; SEGALES, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Vet J**, v. 169, p. 454-6. 2005.
- MANKERTZ, A.; HILLENBRAND, B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. **Virology**, v. 279, p. 429-38. 2001.
- MANKERTZ, A.; CALISKAN, R.; HATTERMANN, K.; HILLENBRAND, B.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; SCHMITT, C.; STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Vet Microbiol**, v. 98, p. 81-8. 2004.

- MARKOWSKI-GRIMSRUD, C.J.; MILLER, M.M.; SCHAT, K.A. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. **J Virol Methods**, v. 101, p. 135-47. 2002.
- MARTOGLIO, B.; DOBBESTEIN, B. Signal sequences: more than just greasy peptides. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 410-415. 1998.
- MCKEOWN, N.E.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS, P.; GUENETTE, D.K.; ELVINGER, F.; FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, p. 1347-51. 2005.
- MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J.C.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J Virol Methods**, v. 80, p. 123-8. 1999.
- MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; O'CONNOR, M.; BROCKBANK, S.; GILPIN, D.; LASAGNA, C.; BORIOSI, G.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, p. 106-12. 2002.
- MCNULTY, M.S. 2006. *Electron micrographs of animal viruses - porcine circovirus* [Online]. <http://www.qub.ac.uk/afs/vs/vsd9.jpg>. [Accessed 2006].
- 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. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **J Gen Virol**, v. 79 (Pt 9), p. 2171-9. 1998.
- MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; WALKER, I.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Arch Virol**, v. 146, p. 835-42. 2001.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; MCNEILLY, F.; NAUWYNCK, H.J. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. **Arch Virol**, v. 150, p. 427-41. 2005.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.; NIELSEN, J.; BOTNER, A.; KRISTENSEN, C.S.; NAUWYNCK, H.J. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. **BMC Vet Res**, v. 2, p. 6. 2006.

- MIGUEL, F.; FIASCHI-TAESCH, N.; LÓPEZ-TALAVERA, J.C.; TAKANE, K.K.; MASSFELDER, T.; HELWIG, J.-J.; STEWART, A.F. The C-Terminal Region of PTHrP, in Addition to the Nuclear Localization Signal, Is Essential for the Intracrine Stimulation of Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells. **Endocrinology**, v. 142, p. 4096–4105. 2001.
- MISINZO, G.; MEERTS, P.; BUBLLOT, M.; MAST, J.; WEINGARTL, H.M.; NAUWYNCK, H.J. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. **J Gen Virol**, v. 86, p. 2057-68. 2005.
- MISINZO, G.; DELPUTTE, P.L.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D.J.; NAUWYNCK, H.J. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. **J Virol**, v. 80, p. 3487-94. 2006.
- MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; CIACCI-ZANELLA, J.R. 2007. Circovirose Suína. In: SOBESTIANSKY, J., BACELLOS, D. (eds.) *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone editora.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; MORGAN, M.K.; YOON, K.J.; PAUL, P.S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 2535-41. 1998.
- NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **J Gen Virol**, v. 81, p. 2281-7. 2000.
- NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.A.; MOROZOV, I.; THACKER, B.J.; SORDEN, S.D.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P.S. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, p. 33-40. 2002.
- NAYAR, G.P.; HAMEL, A.L.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; SPEARMAN, G. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. **Can Vet J**, v. 40, p. 277-8. 1999.
- NIELSEN, J.; VINCENT, I.E.; BOTNER, A.; LADEKAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K.C. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 92, p. 97-111. 2003.
- O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Can Vet J**, v. 42, p. 551-3. 2001.

- OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **J Virol Methods**, v. 117, p. 75-80. 2004.
- OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology**, v. 357, p. 175-85. 2007.
- OPRIESSNIG, T.; THACKER, E.L.; YU, S.; FENAUX, M.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Vet Pathol**, v. 41, p. 624-40. 2004.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, p. 591-615. 2007.
- OPRIESSNIG, T.; MADSON, D.M.; PRICKETT, J.R.; KUHAR, D.; LUNNEY, J.K.; ELSENER, J.; HALBUR, P.G. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. **Vet Microbiol**, v. 131, p. 103-14. 2008.
- OU, J.H.; YEH, C.T.; YEN, S.B. Transport of Hepatitis B Virus Precore Protein into the Nucleus after Cleavage of Its Signal Peptide. **J Virol**, v. 63, p. 5238-5243. 1989.
- PALLARES, F.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S.D.; VILLAR, D.; JANKE, B.H.; YAEGER, M.J.; LARSON, D.J.; SCHWARTZ, K.J.; YOON, K.J.; HOFFMAN, L.J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J Vet Diagn Invest**, v. 14, p. 515-9. 2002.
- PAN, Q.; HE, K.; HUANG, K. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. **Vaccine**, v. 26, p. 2119-26. 2008.
- PARK, J.S.; KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, J.K.; KIM, S.H.; CHAE, C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **J Comp Pathol**, v. 132, p. 139-44. 2005.
- PEREZ-MARTIN, E.; GRAU-ROMA, L.; ARGILAGUET, J.M.; NOFRARIAS, M.; ESCRIBANO, J.M.; GOMEZ-SEBASTIAN, S.; SEGALES, J.; RODRIGUEZ, F. Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. **J Virol Methods**, v. 154, p. 167-74. 2008.
- PESCADOR, C.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BIOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histológicas

associadas a circovirose de suínos das fases de crescimento e terminação de rebanhos no Rio Grande do Sul. *In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos ABRAVES Goiânia p. 2003*

- PRINGLE, C.R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. **Arch Virol**, v. 144, p. 2065-70. 1999.
- QUINTANA, J.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet Rec**, v. 149, p. 357-61. 2001.
- QUINTANA, J.; BALASCH, M.; SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. **Vet Res**, v. 33, p. 229-37. 2002.
- RAMOS-VARA, J.A.; DURAN, O.; RENDER, J.A.; CRAFT, D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. **Vet Rec**, v. 141, p. 479-80. 1997.
- RAYE, W.; MUHLING, J.; WARFE, L.; BUDDLE, J.R.; PALMER, C.; WILCOX, G.E. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. **Aust Vet J**, v. 83, p. 300-4. 2005.
- RESENDES, A.; SEGALES, J.; BALASCH, M.; CALSAMIGLIA, M.; SIBILA, M.; ELLERBROK, H.; MATEU, E.; PLANA-DURAN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. **Vet Res**, v. 35, p. 83-90. 2004.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALES, J.; BALASCH, M.; ROSELL, C.; QUINTANA, J.; FOLCH, J.M.; PLANA-DURAN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. **Vet Rec**, v. 146, p. 762-4. 2000.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A.R.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Am J Vet Res**, v. 63, p. 354-7. 2002.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALES, J.; DOMINGO, M.; PLANA-DURAN, J. Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. **Vet Rec**, v. 153, p. 371-2. 2003.
- ROSELL, C.; SEGALES, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K.S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ

hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **J Comp Pathol**, v. 120, p. 59-78. 1999.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. **Vet Pathol**, v. 37, p. 687-92. 2000a.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; RAMOS-VARA, J.A.; FOLCH, J.M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; DURAN, C.O.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Vet Rec**, v. 146, p. 40-3. 2000b.

ROYER, R.L.; NAWAGITGUL, P.; HALBUR, P.; PAUL, O.S. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **J Swine Health Prod**, v. 9, p. 281-4. 2001.

SANCHEZ, R.E., JR.; NAUWYNCK, H.J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; PENSAERT, M.B. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Vet Microbiol**, v. 83, p. 169-76. 2001.

SCHULZE, C.; NEUMANN, G.; GRUTZE, I.; ENGELHARDT, A.; MIRLE, C.; EHLERT, F.; HLINAK, A. [Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany]. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 110, p. 426-8. 2003.

SEGALES, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; DOMINGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Vet Microbiol**, v. 98, p. 151-158. 2004.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Vet Q**, v. 24, p. 109-24. 2002.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet Microbiol**, v. 98, p. 137-49. 2004.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Anim Health Res Rev**, v. 6, p. 119-42. 2005a.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet Microbiol**, v. 111, p. 223-9. 2005b.

SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.;

- ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Vet Rec**, v. 162, p. 867-8. 2008.
- SHEN, H.G.; ZHOU, J.Y.; HUANG, Z.Y.; GUO, J.Q.; XING, G.; HE, J.L.; YAN, Y.; GONG, L.Y. Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. **J Gen Virol**, v. 89, p. 1857-65. 2008.
- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. **J Vet Med Sci**, v. 65, p. 405-8. 2003.
- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; KITAJIMA, K.; ASAI, T. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 53, p. 278-80. 2006.
- SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J.; BLANCHARD, P.; BADIELLA, L.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; DOMINGO, M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Am J Vet Res**, v. 65, p. 88-92. 2004.
- SILVER, P. How proteins enter the nucleus. **Cell**, v. 64, p. 489-497. 1991.
- SMITH, W.J.; THOMSON, J.R.; DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. **Vet Rec**, v. 132, p. 47. 1993.
- SONG, Y.; JIN, M.; ZHANG, S.; XU, X.; XIAO, S.; CAO, S.; CHEN, H. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. **Vet Microbiol**, v. 119, p. 97-104. 2007.
- SORDEN, S. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. **J Swine Health Prod**, v. 8, p. 136. 2000.
- STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. **Virology**, v. 291, p. 152-60. 2001.
- STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K.; CHOI, J.; LATIMER, K.S.; KANITZ, C.L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **J Vet Diagn Invest**, v. 13, p. 57-62. 2001.
- TAKAHAGI, Y.; NISHIYAMA, Y.; TOKI, S.; YONEKITA, T.; MORIMATSU, F.; MURAKAMI, H. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. **J Vet Med Sci**, v. 70, p. 603-6. 2008.

- THACKER, B.; THACKER, E. The PRDC battle continues. **Pig Progress**, v. 6, p. 16-8. 2000.
- THACKER, B.; WILSON, W.; FRANCISCO, C.; SCHULUETER, R. Circumvent PCV vaccine: Performance evaluation and serological studies update. *In: Proceedings of AAVS Congress* p. 153-6 2008
- THACKER, E.L. Porcine respiratory disease complex - what is it and why does it remain a problem? **Pig J**, v., p. 66-70. 2001.
- THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M.C.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Vet Pathol**, v. 35, p. 108-16. 1998.
- THOMSON, J.; SMITH, B.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MCVICAR, C. PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Vet Rec**, v. 146, p. 651-2. 2000.
- THOMSON, J.R.; MACINTYRE, N.; HENDERSON, L.E.; MEIKLE, C.S. Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Vet Rec**, v. 149, p. 412-7. 2001.
- TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BELAK, K.; BERG, M.; FOSSUM, C. Genetic analysis of PCV2 capsid protein sequences reveals two main groups of Swedish isolates. *In: Conference on animal circoviruses and associated diseases.* p. 82 2005
- TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I.M.; WIKSTROM, F.H.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; MCMENAMY, M.; MCNEILLY, F.; FUXLER, L.; BELAK, K.; PODERSOO, D.; SAAR, T.; BERG, M.; FOSSUM, C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Virus Genes**, v. 36, p. 509-20. 2008.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl Bakteriol Orig A**, v. 226, p. 153-67. 1974.
- TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, p. 64-6. 1982.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Arch Virol**, v. 91, p. 271-6. 1986.
- TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Arch Virol**, v. 96, p. 39-57. 1987.

- TISCHER, I.; BODE, L.; APODACA, J.; TIMM, H.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S.; GERIKE, E. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. **Arch Virol**, v. 140, p. 1427-39. 1995.
- TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. **Vet Microbiol**, v. 98, p. 169-74. 2004.
- TOMÁS, A.; FERNANDES, L.T.; VALERO, O.; SEGALES, J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Vet Microbiol**, v. 132, p. 260-73. 2008.
- TRUONG, C.; MAHE, D.; BLANCHARD, P.; LE DIMNA, M.; MADEC, F.; JESTIN, A.; ALBINA, E. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. **Arch Virol**, v. 146, p. 1197-211. 2001.
- VICENTE, J.; SEGALES, J.; HOFLE, U.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M.; GORTAZAR, C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Vet Res**, v. 35, p. 243-53. 2004.
- VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B.M.; ALLAN, G.M.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K.C. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. **J Virol**, v. 77, p. 13288-300. 2003.
- VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; HERRMANN, B.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K.C. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. **Immunology**, v. 115, p. 388-98. 2005.
- WADDILOVE, A.E.; MARCO, J. Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field. *In: Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress Ames, USA p. 34 2002*
- WALKER, I.W.; KONOBY, C.A.; JEWURST, V.A.; MCNAIR, I.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.M.; COTTRELL, T.S.; ELLIS, J.A.; ALLAN, G.M. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **J Vet Diagn Invest**, v. 12, p. 400-5. 2000.
- WANG, K.; HUANG, L.; KONG, J.; ZHANG, X. Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. **J Virol Methods**, v. 150, p. 1-6. 2008.
- WANG, X.; JIANG, W.; JIANG, P.; LI, Y.; FENG, Z.; XU, J. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 3374-80. 2006.

- WANG, X.; JIANG, P.; LI, Y.; JIANG, W.; DONG, X. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. **Vet Microbiol**, v. 121, p. 215-24. 2007.
- WELLENBERG, G.J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; DE JONG, M.F.; BOERSMA, W.J.; ELBERS, A.R. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. **Vet Microbiol**, v. 99, p. 203-14. 2004.
- WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G.M.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; KRAKOWKA, S.; MCNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J.A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **J Vet Diagn Invest**, v. 11, p. 530-2. 1999.
- WIEDERKEHR, D.D.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; HAESSIG, M.; ZIMMERMANN, D.; POSPISCHIL, A.; BRUGNERA, E.; SIDLER, X. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. **Vet Microbiol**, v. 136, p. 27-35. 2009.
- WU, P.C.; CHIEN, M.S.; TSENG, Y.Y.; LIN, J.; LIN, W.L.; YANG, C.Y.; HUANG, C. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. **J Biotechnol**, v. 133, p. 58-64. 2008.
- ZENTILIN, L.; GIACCA, M. The renaissance of competitive PCR as an accurate tool for precise nucleic acid quantification. **Methods Mol Biol**, v. 630, p. 233-48. 2010.
- ZHU, Y.; LAU, A.; LAU, J.; JIA, Q.; KARUPPANNAN, A.K.; KWANG, J. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. **Virology**, v. 369, p. 423-30. 2007.