

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

DETECÇÃO DE POSSÍVEIS AGENTES VIRAIS ASSOCIADOS À CIRCOVIROSE
SUÍNA

Thais Fumaco Teixeira

PORTO ALEGRE

2008

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

DETECÇÃO DE POSSÍVEIS AGENTES VIRAIS ASSOCIADOS À CIRCOVIROSE
SUÍNA

Autor: Thais Fumaco Teixeira

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciência Veterinárias na área de
Medicina Veterinária Preventiva -
Virologia.

Orientador: Paulo Michel Roehle

PORTO ALEGRE

2008

Thais Fumaco Teixeira

DETECÇÃO DE POSSÍVEIS AGENTES VIRAIS ASSOCIADOS À CIRCOVIROSE
SUÍNA

APROVADA EM JANEIRO DE 2008

APROVADA POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Orientador Presidente da Comissão

Prof. Dr. Paulo Augusto Esteves
Membro da Comissão

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Dedico este trabalho aos meus pais: Acacio e Elenir, por terem sido amigos, companheiros e por terem me ajudado a conquistar mais uma importante etapa.

AGRADECIMENTOS

Ao prezado orientador, Paulo Michel Roehle, pelo exemplo de conduta, pelos ensinamentos, confiança, paciência e orientação.

Ao Frans e a Ana Cláudia pelos conhecimentos repassados.

Aos colegas de laboratório Diógenes Dezen, Carine Holz, Samuel Cibulski, Juliana Reis da Silva, Suzana Caixeta e Cristine Cerva pela amizade e pela troca de conhecimentos.

Agradeço também a Alexandre Braga, Sandra Borowski e David Barcellos por fornecerem subsídios para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Acacio e Elenir, por terem incentivado com amor, carinho e confiança a minha jornada profissional.

A minha tia, Ciça pelo incentivo a mais uma conquista profissional e ao apoio em todos os momentos.

A toda a minha família por acreditarem na minha capacidade.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“O futuro tem muitos nomes: para os fracos, ele é inatingível; para os temerosos, ele é desconhecido; para os corajosos, ele é a chance...”

Vítor Hugo

DETECÇÃO DE POSSÍVEIS AGENTES VIRAIS ASSOCIADOS À CIRCOVIROSE SUÍNA

RESUMO

O Circovirus suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus ubíquo que tem sido associado a um número de síndromes em suínos. Entre elas, a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) tornou-se uma das principais causas de perdas econômicas na suinocultura nacional. No entanto, existe incerteza se o PCV2 é, de fato, o único agente responsável por esse quadro, essencialmente porque a administração isolada do vírus a animais suscetíveis não tem sido capaz de reproduzir experimentalmente a síndrome. Em vista disso, um número de outros agentes infecciosos (e não infecciosos) tem sido examinados e sua potencial participação no desenvolvimento da SMDS tem sido pesquisada. No presente estudo foram realizados experimentos visando determinar se outro(s) agente(s) com genoma de DNA circular poderia(m) desempenhar algum papel no desenvolvimento da SMDS. Para tanto, a técnica denominada “amplificação por círculo rolante com múltiplos primers” (ACRMP) foi empregada. A ACRMP é baseada na atividade da DNA polimerase do fago phi29, uma enzima capaz de sintetizar novas moléculas de DNA a partir de um molde de DNA circular. Numa segunda etapa, o DNA amplificado é clivado com enzimas de restrição, ocasionando a linearização de grande quantidade de cópias do DNA alvo original. Como a ACRMP é realizada com primers aleatórios, nenhum conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos alvo é necessário. Portanto, pode-se teoricamente amplificar DNA circular de qualquer microorganismo, o que a torna ideal para o propósito do presente estudo. O DNA extraído de soros de 67 suínos com sinais clínicos de SMDS, assim como de 63 suínos saudáveis, foram submetidos à ACRMP. O principal achado deste estudo foi que o genoma de um (ou mais) anelovírus foi(ram) detectado(s) em 88,9% (56/63) dos suínos saudáveis, ao passo que o(s) mesmo(s) agente(s) somente foi(ram) detectado(s) em 16,4% (11/67) dos soros de suínos com sinais clínicos da SMDS. Alguns fragmentos de DNA potencialmente correspondentes a fragmentos de genomas virais foram seqüenciados, revelando que pelo menos um deles corresponde a uma seqüência de anelovírus suíno ainda não descrita. No entanto, outro genoma correspondente a um anelovírus foi encontrado na mesma amostra, sugerindo que mais de um vírus pode estar presente em amostras de soro. Estes resultados demonstraram que os anelovírus, de grande variabilidade genética, são significativamente mais prevalentes em suínos clinicamente saudáveis do que em suínos com SMDS.

Palavras-chaves: Circovirus suíno, PCV2, SMDS, Co-infecção, TTV

***DETECTION OF POSSIBLE VIRAL AGENTS ASSOCIATED WITH
POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME.***

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is an ubiquitous virus that has been associated to a number of syndromes in swine. Among these, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) has become a major cause of economic losses in swine worldwide. However, there is uncertainty as to whether PCV2 is in fact the sole agent responsible for the disease, essentially because the disease has not been experimentally reproduced when PCV2 is inoculated onto susceptible animals. In view of that, a number of other infectious (and non infectious) agents have been examined and their potential role in PMWS searched for. This study was carried out to determine whether any other agent(s) with circular DNA genome might be playing some role in PMWS. In order to achieve that, a technique called “randomly primed rolling circle amplification” (RPRCA) was employed. RPRCA is based on the activity of bacteriophage phi29 DNA polymerase, an enzyme that synthesizes new DNA molecules starting from a circularized DNA template. In a second phase, the amplified DNA is cleaved with restriction enzymes, so giving rise to large amounts of linearized copies of the original target DNA. As RPRCA is performed with random priming, no previous knowledge of the target nucleotide sequence is necessary. Therefore, it is theoretically possible to amplify circular DNA of any microorganism, thus making it ideal for the purpose of the present study. DNA extracted from sera of 67 pigs with clinical signs of PMWS as well as from 63 healthy pigs was submitted to RPRCA. The major finding of this study was that the genome of one (or more) anelloviruses was detected in 88,9% (56/63) of the healthy pigs, whereas the same agent was only detected in 16,4% (11/67) of pigs with clinical signs of PMWS. Some of the DNA fragments corresponding to the putative virus genomes were sequenced and revealed at least one non-previously described anellovirus sequence. However, other anellovirus could be found on the same sample, suggesting that more than one genome are present in samples of serum. These results demonstrate that anellovirus, of great genetic variability, were significantly more prevalent in healthy pigs than in pigs with PMWS.

Keywords: Porcine circovirus, PCV2, PMWS, Co-infections, TTV

LISTA DE ABREVIATURAS

BFDV	Vírus da Doença dos Bicos e Penas
CaCV	Circovírus dos canários
cap	gene responsável pela produção da proteína estrutural de PCV
CAV	Vírus da anemia das galinhas
CDRS	Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos
CoCV	Circovírus dos columbídeos
CoGV	Circovírus dos gansos
CsCl	Cloreto de céσιο
CT	Tremor congênito
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECP	efeito citopático
HIS	hibridização <i>in situ</i>
IF	imunofluorescência
IHQ	imuno-histoquímica
IPX	imunoperoxidase
npPCV	PCV não patogênico
ORF	Fase aberta de leitura
ORI	origem de replicação
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PDNS	Síndrome de Dermatite e Nefropatia Suína
PiCV	Circovírus dos pombos
PK-15	células de rim de suíno-15
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
PPV	Parvovírus suíno
PRRSV	Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos
rep	gene responsável pela produção de proteínas envolvidas na replicação de PCV
Rep	proteína replicativa
SDNS	Síndrome de Dermatite e Nefropatia dos Suínos
SIV	Vírus influenza suíno
SMDS	Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos
TCS	tremor congênito
TTV	Torque teno vírus
TTMV	Torque teno mini vírus
TTVMDV	Torque teno midi vírus
TLMV	Torque teno like mini vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Circovírus suíno	15
2.1.1	Classificação	15
2.1.2	Propriedades do vírion	15
2.1.3	Características moleculares	16
2.1.4	Organização genômica	16
2.2	Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS)	18
2.2.1	Histórico	18
2.2.2	Etiologia	19
2.2.3	Epidemiologia	20
2.2.4	Patogenia	21
2.2.5	Sinais Clínicos	22
2.2.6	Lesões macroscópicas	22
2.2.7	Lesões microscópicas	23
2.2.8	Diagnóstico	23
2.3	Outras manifestações clínicas associadas ao PCV2	24
2.3.1	Síndrome de Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS)	24
2.3.2	Complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS)	25
2.3.3	Falhas reprodutivas	26
2.3.4	Tremor congênito (TC)	27
2.4	Infecções concomitantes	27
2.5	Torque teno vírus (TTV) em suínos	28
2.5.1	Organização genômica	29
2.5.2	Patogenia	31

3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivos gerais	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	CAPÍTULO 1	33
4.1	Detection of anelloviruses in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome.	33
5	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

Circovírus suíno

O Circovírus suíno (PCV) pertence à família *Circoviridae*, gênero *Circovirus* (ALLAN et al., 1995). O PCV é tido, presentemente, como o menor vírus animal não envelopado, com um genoma de DNA circular de fita simples e com diâmetro de 17 nm (HAMEL et al., 1998). Dois tipos de PCV (PCV1 e PCV2) já foram caracterizados (ALLAN et al., 1998). O PCV1 é considerado não patogênico para suínos (ALLAN et al., 1995) e foi originalmente identificado como um contaminante persistente de células da linhagem de rim de suíno “PK15” (TISCHER et al., 1982). O PCV2 é o principal agente infeccioso associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS). O PCV2 tem sido também associado a outras síndromes e manifestações clínicas, tais como a Síndrome de Dermatite e Nefropatia dos Suínos (SDNS) (ALLAN et al., 2000; ROSELL et al., 2000; CHOI e CHAE, 2001; CHAE, 2005), à falhas reprodutivas (LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001; KIM et al., 2004), a doenças do complexo respiratório dos suínos (DCRS) (ELLIS et al., 1999a) e à síndrome do tremor congênito (STEVENSON et al., 2001; KENNEDY et al., 2003). Dentre estes, a SMDS é a que apresenta maior impacto econômico.

A SMDS foi identificada pela primeira vez no Canadá em 1991 (CLARK, 1997). Desde então, foi identificada em várias regiões do mundo, evidenciando que a infecção já se encontrava em caráter endêmico praticamente em todas as regiões onde a suinocultura industrial era praticada (ALLAN e ELLIS, 2000; CHAE, 2004) sendo relatada na Ásia, na América do Sul, na América do Norte, na Europa e na Oceania (SEGALÉS et al., 1997; ALLAN et al., 1998; SPILLANE et al., 1998; ONUKI et al., 1999; HINRICHS et al., 1999; WELLENBERG et al., 2000; TRUJANO et al., 2001; ZANELLA e MORÉS, 2001; ALLAN et al., 2002; CELER e CARASOVA, 2002; SARRADELL et al., 2002; SAOULIDIS et al., 2002).

No Brasil, o primeiro registro da SMDS foi realizado no ano de 2000, no Estado de Santa Catarina, embora a infecção pelo PCV2 tenha sido identificada em tecidos de suínos estocados desde 1988 em blocos de parafina (ZANELLA, 2001).

Embora o PCV2 seja aparentemente o principal vírus associado a circovirose suína, nem todos os suínos infectados com PCV2 desenvolvem a síndrome. Isso indica que o curso de muitas infecções por PCV2 é sub-clínico e que o PCV2 necessita cofatores para a reprodução completa da SMDS (WELLENBERG et al., 2004). Um destes

co-fatores pode ser representado por co-infecções com outros agentes (ELLIS et al., 2004). A SMDS tem sido frequentemente encontrada em combinação com outros patógenos virais e bacterianos como o Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos (PRRSV), Parvovirus suíno (PPV), vírus da Influenza Suína (SIV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (PALLARES et al., 2002; ROVIRA et al., 2002; KIM et al., 2003).

Anelovírus

Os anelovírus foram identificados pela primeira vez em 1997 em humanos, sendo o primeiro agente hoje enquadrado nesse grupo denominado “Torque teno” vírus (TTV) (NISHIZAWA et al., 1997, OKAMOTO et al., 1998). Mais tarde, um vírus semelhante foi detectado em animais; por apresentar um genoma menor (2,8-2,9 kb) que o TTV previamente identificado (3,8-3,9 kb), foi denominado de Torque teno “mini vírus” (TTMV) (TAKAHASHI et al., 2000). Ambos TTV e TTMV são vírus pequenos, não envelopados e com genoma de DNA circular de fita simples (NISHIZAWA et al., 1997; ITOH et al., 2000; OKAMOTO et al., 2002). Recentemente, novos anelovírus humano com genoma de 3,2 kb foi identificado e denominados Torque teno “midi vírus” (TTMDV) (NINOMIYA et al., 2007).

Os anelovírus de suínos (TTMV) foram subdivididos em dois genogrupos (OKAMOTO et al., 2002; NIEL et al., 2005) e parecem estar amplamente difundidos nos criatórios em várias regiões do mundo (McKEOWN et al., 2004), incluindo o Brasil (NIEL et al., 2005). Foi relatada uma possível associação entre anelovírus e PCV2 em animais com e sem SMDS, onde os autores relacionaram o genogrupo 2 dos anelovírus suínos com animais afetados pela SMDS (KEKARAINEN et al. 2006). Entretanto, até o presente, não existe nenhuma associação clara desses agentes com qualquer patologia. Por estas razões, os anelovírus parecem ser exemplos de vírus “órfãos”, ou seja, não causadores de enfermidades (BENDINELLI et al., 2001).

Em função das incertezas com relação à determinação da causa precisa da SMDS, é de grande importância para o estabelecimento dos fatores envolvidos no quadro o estudo de outros agentes que possam estar de alguma forma associados ao PCV2 e à ocorrência desse quadro.

A estratégia de amplificação por círculo rolante com múltiplos primers (ACRMP) tem sido usada com sucesso na identificação de agentes com genomas

circulares, como os papilomavírus (RECTOR et al., 2004; RECTOR et al., 2005), anelovírus (NIEL et al., 2005; BIAGINI et al., 2007) e poliomavírus (JOHNE et al., 2006). No presente estudo, buscou-se utilizar a técnica de ACRMP seguida de restrição enzimática para a tentativa de identificar outros possíveis agentes virais associados à circovirose suína.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Circovírus suíno*

2.1.1 Classificação

O *circovírus suíno* (PCV) pertence à família *Circoviridae*, que se subdivide em dois gêneros: *Circovirus* e *Gyrovirus*. O gênero *Circovirus* compreende o *Circovírus suíno* tipo 1 e tipo 2 (PCV1 e PCV2), o Vírus da Doença dos Bicos e Penas (BFDV), *Circovírus dos Columbídeos* ou *Pombos* (CoCV/PiCV), *Circovírus dos Gansos* (CoGV) e *Circovírus dos Canários* (CaCV) (MANKERTZ et al., 1997; BASSAMI et al., 1998; MANKERTZ et al., 2000; TODD et al., 2001). O gênero *Gyrovirus* compreende o Vírus da Anemia das Galinhas (CAV) (KATO et al., 1995).

Dois tipos de PCV foram caracterizados e subsequentemente denominados PCV1 e PCV2 (MEEHAN et al., 1998). O PCV1 é um contaminante persistente de células de linhagem de rim de suínos, PK-15 (TISCHER et al., 1974) sendo considerado não patogênico (npPCV) para suínos (TISCHER et al., 1982; ALLAN et al., 1995). Em contraste, o PCV2 é identificado como principal agente infeccioso da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) e tem sido associado a outras síndromes e manifestações clínicas tais como: a Síndrome de Dermatite e Nefropatia dos Suínos (SDNS) (THIBAUT et al., 1998; ROSELL et al., 2000; ALLAN et al., 2000a; CHOI e CHAE, 2001; CHAE, 2005), falhas reprodutivas (WEST et al., 1999; JOSEPHSON e CHARBONNEAU, 2001; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001; KIM et al., 2004), doenças do complexo respiratório dos suínos (CDRS) (ELLIS et al., 1999a) e tremor congênito (TCS) (STEVENSON et al., 2001; KENNEDY et al., 2003).

2.1.2 Propriedades do vírion

O vírion do PCV não é envelopado, apresenta simetria icosaédrica e mede de 15 a 17 nm de diâmetro. É o menor vírus animal descrito, tanto em diâmetro quanto em tamanho de genoma, com capacidade de replicação autônoma em células de mamíferos.

Sua replicação ocorre, obrigatoriamente, durante a multiplicação celular, pois o vírus depende de proteínas produzidas durante a fase S da mitose (STUDDERT, 1993).

O PCV apresenta densidade de flutuação 1,33-1,34 mg/ml em gradiente de CsCl e coeficiente de sedimentação de 57S quando comparado com o coeficiente de sedimentação de um enterovírus bovino. O vírus não possui atividade hemaglutinante e é resistente ao clorofórmio, ao pH 3,0 e a temperaturas de 56 °C e 70 °C por 15 minutos (ALLAN et al., 1994b).

2.1.3 Características moleculares

O genoma do PCV é constituído de DNA circular ambisenso de fita simples, circular e com, aproximadamente, 1,76 kb. Essa estrutura apresenta uma região intergênica na qual são flanqueadas as duas principais fases abertas de leitura (*open reading frames* – ORFs) denominadas ORF1 e ORF2. Além destas duas ORFs, outras já foram mapeadas, porém as funções das proteínas codificadas ainda não foram descritas (MANKERTZ et al., 2004).

A análise das seqüências de nucleotídeos do genoma total do PCV2 revela uma identidade de aproximadamente 95% entre os isolados. Quando o PCV2 é comparado ao PCV1, o genoma total apresenta identidade entre 68 e 76%. Comparando as ORFs1 e 2, a identidade nucleotídica entre PCV1 e 2 é de 83 e 67% e a de aminoácidos de 86 e 63%, respectivamente (ALANN e ELLIS, 2000).

2.1.4 Organização genômica

O PCV possui dois genes principais que codificam as proteínas *rep* e *cap*. O gene *cap* está localizado na fita viral negativa e é formado por duas regiões: uma região promotora localizada na ORF1 de 108 nucleotídeos e uma região codificadora formada pela ORF2. A transcrição desse gene dá origem a um pré-mRNA, também denominado transcrito imediato, o qual sofre um processo denominado *splicing* gerando um mRNA (maduro) com uma fase aberta de leitura contínua (Fig. 1a) (CHEUNG, 2003). A ORF2 tem 699 nucleotídeos e codifica a proteína estrutural formadora do capsídeo (Cap) de 30 kDa, composta por 233 aminoácidos (NAWAGITGUL et al., 2000).

O gene *rep* tem uma fase de leitura aberta, a ORF1, que se estende do nucleotídeo 51 ao 995 e está localizada na fita viral positiva. Este gene codifica as duas principais proteínas envolvidas na replicação, a Rep e a Rep'. Dois transcritos co-lineares são sintetizados pelo gene *rep*: o primeiro compreende totalmente a ORF1 com 945 nucleotídeos que codifica a proteína Rep com 315 aa e o segundo transcrito sofre um *splicing*, resultando na Rep' com 168 aa (MANKERTZ e HILLENBRAND, 2002; CHEUNG, 2003).

Um terceiro gene denominado ORF3 foi recentemente descrito (LIU et al., 2005). A proteína codificada por este gene não é essencial para a replicação do PCV2 e parece ter um papel importante na indução de apoptose em células PK-15 (LIU et al., 2005).

A origem da replicação (ORI), localizada na região intergênica do genoma do PCV2, é contida por aproximadamente 84 nt (posição 1735 ao 1768 e 1 ao 51) (Fig.1b). Essa região é formada por uma região palindrômica, um octanucleotídeo (5' AGTATTAC 3') e quatro repetições do hexâmero 5' CGGCAG 3' (Fig. 1b) essenciais para a replicação do PCV2 (CHEUNG, 2004; MANKERTZ et al., 2004; CHEUNG, 2005; CHEUNG, 2006). Semelhanças na seqüência e na estrutura sugerem que a replicação do PCV seja por circulo rolante, mecanismo similar ao da família *Geminiviridae* (GUTIERREZ, 1999; HANLEY-BOWDOIN et al., 2000). As duas proteínas Rep reconhecem e se ligam a estrutura palindrômica, desestabilizando e desenrolando a Ori e então o octanucleotídeo é clivado (5' AGTATT↓AC 3') gerando uma extremidade 3'OH livre para o início da síntese da fita positiva (CHEUNG, 2004; CHEUNG, 2005). Uma vez que o PCV não apresenta nenhuma atividade de DNA polimerase, a polimerização do genoma viral é realizada por enzimas celulares (CHEUNG, 2006).

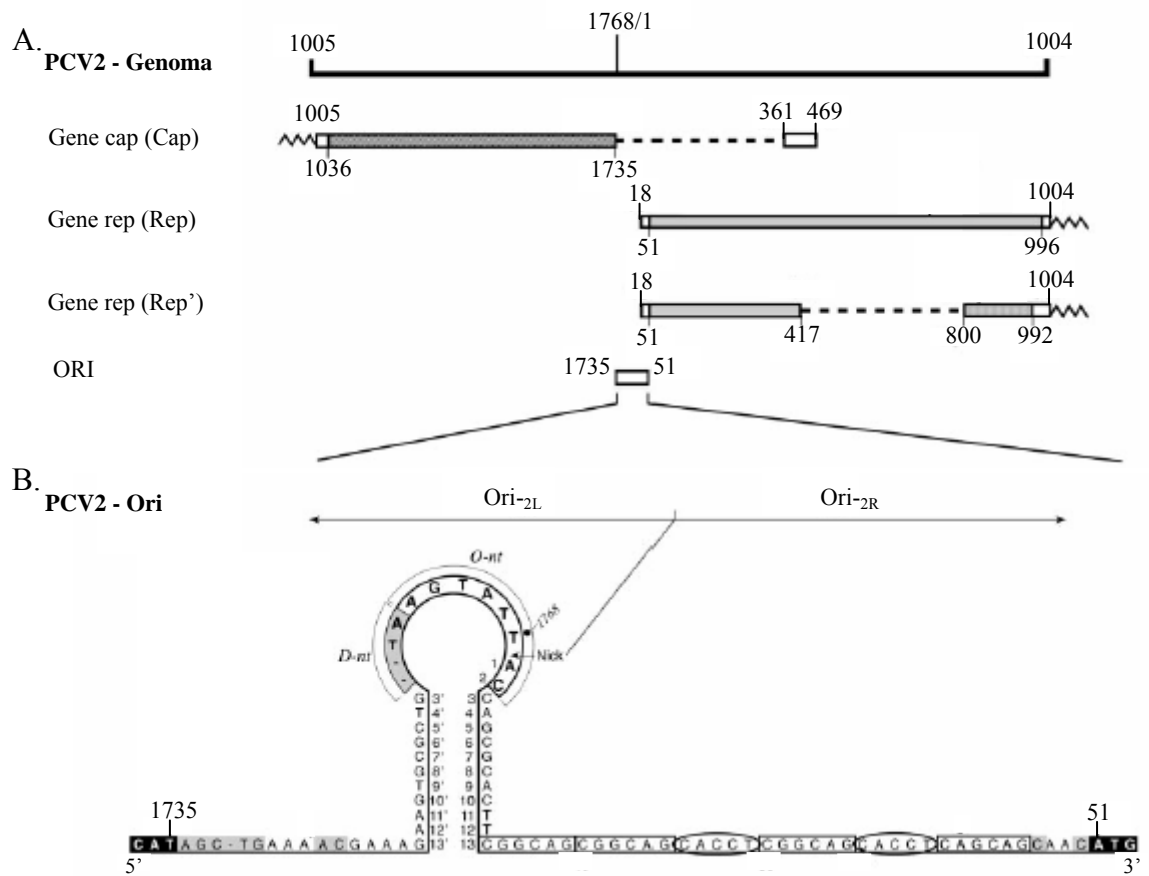


Figura 1. (A) Representação linear do genoma de PCV2. Em cinza estão as regiões codificadoras das proteínas Cap, Rep e Rep'. Em branco estão representadas as regiões não codificantes. O pontilhado mostra a região de *splicing* e \sim representa a cauda de poli A. (B) Representação esquemática da região intergênica, que compreende a origem de replicação, de PCV2 com a seqüência palindrômica arranjada em alça (*stem-loop*). Nas regiões 5' e 3', em preto, estão os códons de iniciação das proteínas Cap e Rep, respectivamente. Adaptado de CHEUNG (2006).

2.2 Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS)

2.2.1 Histórico

A Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) termo derivado de *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*- PMWS) é uma doença emergente, causada pelo Circovírus suíno tipo 2 (PCV2). O termo SMDS foi proposto, na ocasião, para descrever a condição clínica dos leitões examinados, que se caracterizou por

definhamento e palidez na fase de creche e por apresentação de lesões em múltiplos órgãos, especialmente nos tecidos linfóides (HARDING et al., 1998).

Estudos sorológicos realizados na Alemanha (TISCHER et al., 1982; TISCHER et al., 1986), Canadá (DULAC e AFSHAR, 1989), Nova Zelândia (HORNER, 1991), Grã-Bretanha (EDWARDS e SANDS, 1994), Irlanda do Norte (ALLAN et al., 1994b) e Estados Unidos da América (HINES e LUCKERT, 1995) revelaram uma ampla infecção por PCV2 em suínos adultos. Entretanto, a primeira referência à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), doença de etiologia desconhecida que vinha ocorrendo na Europa e Estados Unidos, foi realizada no Canadá em 1991 (CLARK, 1997). Desde então, a SMDS adquiriu um caráter endêmico (ALLAN e ELLIS, 2000; CHAE, 2004) sendo relatada na Ásia, na América do Sul, na América do Norte, na Europa e na Oceania (SEGALES et al., 1997; ALLAN et al., 1998; SPILLANE et al., 1998; ONUKI et al., 1999; HINRICHS et al., 1999; WELLENBERG et al., 2000; TRUJANO et al., 2001; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2001; ALLAN et al., 2002; CELER e CARASOVA, 2002; SARRADELL et al., 2002; SAOULIDIS et al., 2002).

No Brasil, a SMDS foi diagnosticada pela primeira vez no Estado de Santa Catarina em 2001, embora a infecção tenha sido identificada na população suína do Brasil desde 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006). Esta enfermidade também foi relatada na região Sudeste (FRANÇA et al., 2005) e, no Rio Grande do Sul, foi descrita pela primeira vez em 2003 (PESCADOR et al., 2003).

2.2.2 Etiologia

Apesar da etiologia da síndrome não ter sido completamente elucidada, existe evidências de estudos experimentais e a campo que apontam a íntima associação desta com o PCV2 (ALLAN e ELLIS, 2000; KIM e LYOO, 2002; ELLIS et al., 2004). Alguns autores sugerem que para o completo desenvolvimento da síndrome, há a necessidade de co-infecção com outros agentes infecciosos como o Parvovirus Suíno (PPV) ou o Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos (PRRSV) (ALLAN et al., 1999a; CHOI e CHAE, 2000; HARMS et al., 2001) ou co-fatores imunostimulatórios (KRAKOWKA et al., 2001; KYRIAKIS et al., 2002).

2.2.3 Epidemiologia

A detecção de PCV2 foi descrita em suínos com e sem sinais clínicos de SMDS em países da Europa, Ásia, América do Sul, do Norte e Oceania (ALLAN e ELLIS, 2000; MAGAR et al., 2000; CIACCI-ZANELLA et al., 2001; SARRADELL et al., 2002; SEGALÉS;DOMINGO, 2002; CASTRO et al., 2003b; CASTRO et al., 2004; RAYE et al., 2005; VIGRE et al., 2005). Recentemente, o agente foi detectado também em suínos selvagens (*Sus scrofa*) (KNELL et al., 2005). No Brasil, o PCV2 associado com a SMDS foi diagnosticado, pela primeira vez, no Estado de Santa Catarina. A presença de antígenos e de DNA de PCV2 foi confirmada através da técnica de imunoperoxidase (IPX) e da reação em cadeia da polimerase (PCR), respectivamente (ZANELLA & MORÉS, 2001). Atualmente, a SMDS é descrita em outros estados como: Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003), Paraná, São Paulo (CASTRO et al., 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2005a), Espírito Santo (CHIARELLI et al., 2005) e Minas Gerais (PINTO et al., 2003; BARBOSA, 2005).

A faixa etária mais comumente afetada pela SMDS situa-se entre 2-4 meses (SEGALÉS et al., 2005). As taxas de morbidade observadas nas granjas atingidas situam-se geralmente entre 4 e 30%, com uma taxa de letalidade típica em torno de 70-80%, o que pode variar em função das condições da granja e do lote de animais (LAVAL, 2004). Alguns fatores de risco causadores de estresse como densidade elevada, baixa qualidade do ar e misturas de lotes com idades diferentes podem exacerbar os sintomas e a gravidade da doença (ZANELLA, 2005). As taxas de mortalidade encontradas variam entre 4 a 20% (SEGALÉS et al., 2005).

A detecção de PCV2 em *swab* nasal, tonsilar, brônquico, urinário e fecal levanta a hipótese de que o agente pode ser transmitido via secreção oronasal, fecal e urinária (SEGALÉS e DOMINGO, 2002), o que indica a disseminação horizontal da doença (FERNANDES et al., 2003b). A associação do PCV2 com falhas reprodutivas indica que a transmissão vertical também pode ser importante (PENSAERT et al., 2004; MALDONADO et al., 2005).

2.2.4 Patogenia

O PCV2 é o principal agente associado a SMDS, no entanto, nem todos os animais infectados com PCV2 irão desenvolver a doença. Vários experimentos na tentativa de reproduzir a SMDS foram publicados na literatura. Os primeiros experimentos utilizando tecidos homogeneizados (BALASCH et al., 1999) ou PCV2 isolado e propagado em cultivo celular (ELLIS et al., 1999; MAGAR et al., 2000; PORGRANINCHNIY et al., 2000) reproduziram lesões histológicas de SMDS com intensidade baixa a moderada, mas não a síndrome completa. No entanto, em um estudo com leitões privados da ingestão de colostro (PIC) a doença clínica e as lesões consistentes com SMDS foram relatadas em 1 dos 4 leitões inoculados com apenas PCV2 (ALLAN et al., 1999a; KENNEDY et al., 2000). Percentagem mais elevada ou similar de animais inoculados com apenas PCV2 também foram relatadas por outros autores (BOLIN et al., 2001; HARMS et al., 2001; OKUDA et al., 2003). Conseqüentemente, isso tem sugerido que a infecção por PCV2, ligada a outros cofatores, é necessária para o desenvolvimento completo da doença em suínos. A reprodução mais consistente da SMDS tem sido obtida através da utilização de cofatores infecciosos (ALLAN et al., 1999a; KRAKOWKA et al., 2000; ALLAN et al., 2003) e não infecciosos (KRAKOWKA et al., 2001). A reprodução completa da doença tem sido relatada em uma alta percentagem de leitões PIC e gnotobióticos (GN) co-inoculados com PCV2 e parvovírus suíno (PPV), ou inoculados com um potente imunostimulante, como a hemocianina do molusco *keyhole limpet* (KLH) em adjuvante incompleto de Freund's. Os mecanismos pelos quais outros vírus ou a imunostimulação podem desencadear o desenvolvimento completo da SMDS em suínos infectados com PCV2 permanece desconhecida. Tem sido especulado que a estimulação antigênica com agentes infecciosos e não infecciosos aumenta o número de células permissivas para a replicação do PCV2 entrando na fase S do ciclo celular (ELLIS et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2000), uma condição necessária para a replicação do PCV (TISCHER et al., 1987).

Suínos com SMDS apresentam um aumento de monócitos circulantes, redução de células T (principalmente CD4+ e CD8+), linfócitos B e baixa densidade de granulócitos imaturos quando comparados com suínos saudáveis não infectados com PCV2 (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Recentemente, evidenciou-se que o PCV2

induz apoptose em linfócitos B, levando à severa depleção linfóide e imunossupressão sistêmica (MANDRIOLI et al., 2004; LIU et al., 2005).

2.2.5 Sinais Clínicos

A SMDS acomete leitões de 5 a 16 semanas de idade (HARDING e CLARK, 1997; ALLAN e ELLIS, 2000; PALLARES, 2002; SEGALÉS e DOMINGO, 2002). É caracterizada por apresentar atraso no crescimento com emagrecimento progressivo, palidez corporal, algumas vezes com icterícia, aumento dos linfonodos inguinais e sintomas respiratórios (taquipnéia, dispnéia e tosse) e digestivos (diarréia), os quais não regridem com tratamentos antimicrobianos de uso comum na suinocultura (ALLAN e ELLIS, 2000; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003a, 2003b; HARDING, 2004; SARRADELL et al., 2004).

2.2.6 Lesões macroscópicas

As lesões macroscópicas em suínos afetados pela circovirose suína são observadas principalmente nos linfonodos, pulmões e, com menor frequência, no fígado e nos rins (CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999). As lesões mais evidentes costumam aparecer nos linfonodos inguinais, mesentéricos, mediastínicos e submandibulares (ROSELL et al., 1999). Os pulmões se apresentam não colapsados, com áreas de consolidação crânio-ventral e apresentam edema interlobular. Ulceração na área aglandular do estômago também é bastante frequente (ROSELL et al., 1999; SEGALÉS, ROSELL, DOMINGO, 2004; CORRÊA et al., 2006). O fígado pode apresentar-se sem alterações ou de tamanho aumentado, pálido, com consistência firme e com superfície irregular. Em casos mais avançados da doença, pode ainda apresentar-se flácido, de tamanho reduzido e com coloração alaranjada (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005). Alguns animais podem apresentar rins com múltiplos pontos brancos na superfície (SEGALÉS, ROSELL, DOMINGO, 2004; CORRÊA et al., 2006) e intestinos, principalmente íleo e cólon, com parte afinada e conteúdo líquido (DARWICH, SEGALÉS, MATEU, 2004).

2.2.7 Lesões microscópicas

As lesões histopatológicas nos órgãos linfóides de animais com SMDS são bastante características. Um grau variável de depleção linfocitária com perda da arquitetura folicular é visto em praticamente todos os animais apresentando a doença, achado que é acompanhado de uma infiltração multifocal ou difusa e de grau leve ou intenso, de histiócitos e/ou células gigantes multinucleadas. Em um grande número de casos, inclusões citoplasmáticas de tamanhos variados, esféricas, basofílicas e bem demarcadas do PCV2 são vistas em histiócitos e em células dendríticas (SEGALÉS, ROSELL, DOMINGO, 2004). Os pulmões apresentam pneumonia intersticial com infiltrado mononuclear, composto predominantemente por macrófagos e linfócitos. Broncopneumonia purulenta dos lobos anteriores ou pneumonia necrótica, atribuídas a infecções bacterianas concorrentes também são observadas (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005). O fígado caracteriza-se por infiltração linfocitária periportal, necrose individual de hepatócitos e presença de corpos apoptóticos (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005; CORRÊA et al., 2006). No rim verifica-se nefrite intersticial linfocitária de distribuição multifocal (CHAE, 2004). Esporadicamente, são observadas lesões na glândula adrenal (adrenite linfoplasmocitária na capa fasciculada), no pâncreas (pancreatite linfocitária multifocal) e encéfalo (meningite fibrino-purulenta, encefalite mononuclear) (ALLAN e ELLIS, 2000; CIACCI-ZANELLA et al., 2003a; PESCADOR et al., 2003).

2.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da circovirose é estabelecido baseado em três critérios: presença de sinais clínicos compatíveis, presença de PCV2 nas lesões e presença de lesões microscópicas características, como depleção linfóide moderada à severa ou linfadenite granulomatosa (CHAE, 2004). Na literatura, muitos métodos de diagnóstico têm sido descritos para identificação de PCV2 em suínos. O isolamento viral de amostras de tecidos é um deles, porém, neste caso, as técnicas de imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IPX) são utilizadas para a confirmação do isolamento, pois o agente não produz efeito citopático (ECP) detectável nos cultivos celulares (ALLAN e ELLIS, 2000).

Diante das dificuldades associadas com o isolamento de PCV2 em culturas de células, tem-se priorizado estudos conduzidos com métodos diagnósticos que visam à detecção de antígenos ou DNA virais (ALLAN e ELLIS, 2000). Para a presença do PCV2 nos tecidos, têm sido empregadas as técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (HIS), que permitem a análise da arquitetura histológica em relação à presença do agente (CHAE, 2004). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada para detectar fragmentos específicos do DNA de PCV2 a partir de diversas amostras, como: sangue total, soro, secreções orofaríngeas e nasais, fezes, sêmen e tecidos fixados em formol. O uso de materiais antigos fixados, também permitiu a realização de estudos retrospectivos para o PCV2 (KIM e CHAE, 2001; KIM et al., 2001; SHIBATA et al., 2003).

Como o PCV2 também pode ser identificado em animais saudáveis, a determinação da carga viral pode ser empregada como ferramenta auxiliar, uma vez que alguns autores sugerem o limite de 10^7 cópias do genoma viral por ml de sangue ou soro para considerar o diagnóstico da SMDS (LIU et al., 2000; OLVERA et al., 2004).

2.3 Outras manifestações clínicas associadas ao PCV2

2.3.1 Síndrome de Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS)

A síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDNS) foi descrita pela primeira vez em 1993 no Reino Unido (SMITH et al., 1993). Desde então, países em todo o mundo têm relatado casos dessa condição, sugerindo a distribuição mundial de SDNS. Caracteriza-se pela presença de petéquias cutâneas localizadas principalmente na área perineal (HÉLIE et al., 1995; SEGALÉS et al., 1998), afetando leitões nas fases de desmame, crescimento e terminação (THOMPSON et al., 2000a). Os rins, macroscopicamente, apresentam-se aumentados, anêmicos e cobertos por petéquias. O principal achado histológico nos casos de SDNS é a presença de glomerulonefrite fibrino-exudativa. Esse achado microscópico, juntamente com a presença de imunoglobulinas e fatores do complemento nos vasos e glomérulos afetados, sugerem uma reação de imunocomplexos (hipersensibilidade do tipo III) como um possível

mecanismo patogênico para essa apresentação (SIERRA et al., 1997). Fibrose intersticial difusa, nefrite intersticial linfoistiocitária com dilatação de material proteináceo nos túbulos normalmente acompanham a lesão glomerular. Depleção linfocitária de linfonodos moderada a massiva tem sido regularmente observada. Em aproximadamente 50 % dos suínos afetados há infiltrado inflamatório granulomatoso com histiócitos e células gigantes nos linfonodos, principalmente na região folicular. Outra lesão comum de animais que apresentam SDNS é a pneumonia intersticial (SEGALÉS et al., 2004). Alguns suínos com lesão renal e sem lesões de pele e outros com lesão renal discreta ou ausente são considerados casos atípicos da SDNS e têm vasculite necrosante sistêmica (SEGALÉS et al., 2004).

Estudos retrospectivos na Irlanda do Norte demonstraram que a associação desse agente com a síndrome data de 1990 (ALLAN et al., 2000; GRESHAM et al., 2000; ROSELL et al., 2000). No entanto, alguns trabalhos sugerem que outros agentes como PRRSV e a *Pasteurella multocida* podem estar associados a PDNS (THIBAUT et al., 1998; ROSELL et al., 2000; LAINSON et al., 2002). O papel do PCV2 na patogenia da síndrome ainda não foi completamente esclarecido. Porém, DNA e antígenos virais foram detectados em tecidos de animais com SDNS (ALLAN et al., 2000a; CHOI e CHAE, 2001), o que sugere o envolvimento do agente com a síndrome, apesar do vírus não ter sido detectado em todos os casos relatados (ROSELL et al., 2000).

2.3.2 Complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS)

O complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) caracteriza-se por crescimento vagaroso e irregular, redução no consumo alimentar, alta conversão alimentar, tosse e pneumonia, acometendo leitões entre 16 e 22 semanas de idade. Os principais patógenos envolvidos no desenvolvimento do complexo são PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. No entanto, outros agentes, também, foram detectados em surtos de CDRS, dentre eles o PCV2 (SEGALÉS et al., 2004). As lesões características do CDRS associado ao PCV2 são pneumonia broncointersticial com fibrose peribronquial e peribronquiolar. Os septos alveolares se apresentam espessos com um infiltrado linfoistiocitário (KIM et al., 2003). No entanto, em muitos casos não há como diferenciar claramente entre CDRS e SMDS, uma vez que ambos são clinicamente muito semelhantes (SEGALÉS et al., 2004). Na maioria dos casos de CDRS observa-se

a co-infecção de PCV2 com PRRSV, influenza vírus suíno e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Porém, ressalta-se que a associação entre PCV2 e PRRSV torna o quadro da doença mais severo (HARMS et al., 2001).

2.3.3 Falhas reprodutivas

Existem vários casos de falhas reprodutivas associadas ao PCV2. O envolvimento deste agente em distúrbios reprodutivos foi descrito primeiramente em duas granjas do Canadá em 1999. Posteriormente, relatos semelhantes foram realizados em Iowa (EUA), no oeste da Europa e na Coreia (WEST et al., 1999; LYOO et al., 2001; HARDING, 2004; KIM et al., 2004). Os sinais clínicos observados nas granjas acometidas foram taxas elevadas 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). A detecção do PCV2 em fetos e natimortos infectados no útero indicam que a transmissão vertical pode ser um importante meio de transmissão (WEST et al., 1999). A transmissão placentária em leitões também já foi reproduzida com sucesso (LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001).

O PCV2 é detectado nos tecidos fetais e em lesões cardíacas de leitões com miocardites através das técnicas de isolamento viral, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), imunohistoquímica e hibridização *in situ* (WEST et al., 1999; O'CONNOR et al., 2001; CHAE, 2005). Na histopatologia, são visualizadas lesões principalmente nos pulmões e coração dos fetos. No pulmão, é vista uma infiltração mononuclear no espaço alveolar e, no coração, degeneração de miócitos, edema e fibrose com presença de infiltrado linfocitário (WEST et al., 1999; KIM et al., 2004b). Lesões histológicas significativas não são encontradas em outros órgãos. O índice de viremia é um fator importante para o PCV2 atravessar a barreira transplacentária. Isso pode ocorrer na forma livre de vírus circulante, associado com células ou de ambas as formas (PENSAERT et al., 2004).

A idade do feto no momento da infecção é o principal fator determinante. Fetos inoculados com PCV2 no primeiro mês de gestação morrem e são reabsorvidos. Fetos inoculados no segundo mês, ou morrem, ou são abortados. Nesses casos, o miocárdio desses animais tem abundante proteína viral. Fetos infectados no terço final de gestação

são minimamente afetados e nascem virêmicos e soropositivos (SANCHEZ et al., 2001), podendo ou não morrer da infecção (PENSAERT et al., 2004).

A ausência de ácido nucléico ou antígeno de PCV2 em amostras de tecidos enviadas para a Universidade de Saskatchewan, entre 1995 e 1998, oriundas de granjas com distúrbios reprodutivos, mostraram que esta associação de PCV2 é uma manifestação clínica recente (BOGDAN et al., 2001).

2.3.4 Tremor congênito (TC)

Tremor congênito (TC), também denominado mioclonia congênita, caracteriza-se pelo tremor da cabeça e pernas de leitões recém-nascidos. O tremor congênito divide-se em dois tipos (A e B) baseados na presença (A) ou ausência (B) de mielina no sistema nervoso central ou periférico. (SEGALÉS et al., 2004). As possíveis causas incluem: A1, vírus da peste suína clássica; A2, vírus da doença de Aujeszky ou infecção viral desconhecida; A3, gene recessivo ligado ao sexo; A4, gene recessivo autossômico e A5, intoxicação por Triclorfon. A causa A2 parece ser a forma mais comum do tremor congênito e é caracterizada por contrações clônicas de variável intensidade que diminuem com o passar do tempo e resolvem espontaneamente com, no máximo, quatro semanas de idade. A mortalidade nos animais afetados pode passar de 50% e é resultante da impossibilidade de aleitamento e esmagamentos (CHAE, 2005). Hines & Lukert (1994) foram os primeiros a relatar a potencial associação do PCV2 ao tremor congênito A2. Posteriormente, Stevenson et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, imunofluorescência indireta e PCR, demonstraram a presença de ácido nucléico e antígenos de PCV2 no cérebro e medula espinhal de animais com TC, permitindo a associação do agente com a enfermidade. No entanto, Kennedy et al. (2003) e Ha et al. (2005) não confirmam essa associação.

2.4 Infecções concomitantes

Estudos experimentais com a finalidade de reproduzir a SDMS têm demonstrado que o PCV2 é um fator necessário, porém não suficiente no desenvolvimento da síndrome. Outros agentes têm sido estudados em co-infecções, dentre eles destacam-se o parvovírus suíno (PPV) e o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva (PRRSV)

(ALLAN et al., 1999; CHOI; CHAE, 2000; KENNEDY et al., 2000; HARMS et al., 2001; KRAKOWKA et al., 2001; CHOI et al., 2002). Nas propriedades nas quais a SDMS é relatada, geralmente, observa-se à associação entre o PCV2 e outros vírus (PRRSV, PPV, influenza suína e coronavírus) e/ou bactérias (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*) (KIM et al., 2001; PALLARES et al., 2002; CASTRO, et al., 2002a; BERSANO et al., 2003; MORENO et al., 2003; RUIZ et al., 2004). Essas co-infecções intensificam os sinais clínicos da SDMS, dificultando a sua identificação. POGRANICHNIY et al. (2002) realizaram um estudo de caso em suínos com história clínica e lesões histológicas características de SMDS e em suínos saudáveis. Entre todos os vírus testados: PCV2, PRRSV, PPV, enterovírus suíno (PEV) tipo 1 e 3, influenzavírus suíno (SIV), coronavírus respiratório suíno (PRCV), vírus da gastro enterite transmissível (TGEV), retrovírus endógeno de suíno (PERV), herpesvírus linfotrópico de suíno tipo 1 (PLHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV), O PCV2 foi o que apresentou maior associação com a SMDS. O risco para o desenvolvimento da SMDS foi mais alto se o suíno estava co-infectado com PCV2 e PRRSV.

Recentemente, foi reportada a associação entre Torque teno vírus (TTV) e o PCV2 em animais com e sem a SMDS (KEKARAINEN et al., 2006). O Torque teno vírus de suíno (TTVs) foi reconhecido primeiramente no Japão (OKAMOTO et al., 2002) e logo após foi relatado na América do Norte, Espanha, China, Coreia, Tailândia (McKEOWN et al., 2004) e Brasil (NIEL et al., 2005) confirmando a distribuição mundial deste vírus.

2.5 Torque teno vírus (TTV) em suínos

O TTV é um vírus pequeno, não envelopado com um diâmetro de 30-32 nm o qual contém um genoma de DNA circular de fita simples, senso negativa (ITOH et al., 2000; OKAMOTO et al., 2002). Foi descoberto pela primeira vez, em 1997, em um paciente humano com uma hepatite pós-transfusão de etiologia desconhecida e foi nomeado com as iniciais do nome do paciente (NISHIZAWA et al., 1997). Inicialmente, por causa do genoma circular, o TTV foi associado com a família *Circoviridae*, juntamente com *Circovirus* suíno tipo 1 e 2, Vírus da Doença dos Bicos e Penas, Vírus da Anemia das Galinhas e TTV-like minivirus, mas foi recentemente reclassificado dentro de um novo gênero chamado *Anellovirus* (BIAGINI et al., 2005).

O Torque teno vírus tem sido frequentemente detectado em plasma de humanos no mundo todo (NIEL et al., 1999) mostrando uma alta diversidade genômica (MUSHAHWAR et al., 1999). Até o momento, não há nenhuma relação clara com nenhuma patologia determinada. Por estas razões, o TTV pode ser considerado como um vírus órfão, um vírus a espera de ser claramente relacionado a uma determinada doença (BENDINELLI et al., 2001). TTV geneticamente relacionados, mas distintos daqueles descoberto em humanos têm sido recentemente descritos em suínos, frangos, vacas, ovelhas (LEARY et al., 1999; OKAMOTO et al., 2002; McKEOWN et al., 2004; BIGARRÉ et al., 2005; NIEL et al., 2005; KEKARAINEN et al., 2006), cães e gatos (OKAMOTO et al., 2002). O TTV também tem sido detectado em primatas não-humanos (LEARY et al., 1999; ABE et al., 2000; XIAO et al., 2002) e em *Tupaia belangeri chinensis* (OKAMOTO et al., 2001).

O TTV suíno tem sido relatado em diferentes países (LEARY et al., 1999; OKAMOTO et al., 2002; MCKEOWN et al., 2004; BIGARRÉ et al., 2005; NIEL et al., 2005; KEKARAINEN et al., 2006), e análises de seqüências têm demonstrado que as cepas apresentam entre 71% e 100% de identidade de nucleotídeos (MCKEOWN et al., 2004; BIGARRÉ et al., 2005). Análises filogenéticas têm demonstrado que aparentemente, as cepas de suínos não estão associadas com a sua origem geográfica (MCKEOWN et al., 2004). Além disso, a epidemiologia da infecção dentro e entre rebanhos suínos e os fatores de risco associados ainda são desconhecidos. Até o momento, dois genogrupos distintos foram identificados em suínos domésticos (NIEL et al., 2005). A detecção viral através de PCR específico para o genogrupo 1 em amostras de soro de diferentes regiões geográficas (Canadá, China, Coréia, Espanha, França, Tailândia e Estados Unidos) revelou uma prevalência que varia de 33% a 100% (McKEOWN et al., 2004; BIGARRE et al., 2005). A prevalência dos genogrupos 1 e 2 na Espanha é 60% e 77% respectivamente (KEKARAINEN et al., 2006).

2.5.1 Organização genômica

O TTV suíno tem demonstrado ser geneticamente relacionado ao TTV humano e compartilha uma organização genômica similar. O comprimento genômico de isolados de TTV parecem diminuir conforme diminui a ordem animal. Em particular, cepas de

suínos apresentaram um genoma de 2,9 kb, em vez de 3,4 – 3,9 kb de isolados humanos (OKAMOTO et al., 2002).

O genoma viral do TTV humano consiste de 4 fases abertas de leitura (ORFs) que são altamente divergentes e uma região não codificante relativamente conservada de aproximadamente de 1,2 kb com 83,4 % de identidade entre isolados de humanos (OKAMOTO et al., 1999). O TTV suíno tem organização genômica similar, mas compartilha menos de 45% de identidade entre nucleotídeos e contém 3 ORFs (OKAMOTO et al., 2002).

As ORFs 1 e 2 estão circundadas pelo TATA box e pelo sinal de poliadenilação e a região rica em GC se encontra no meio da região não traduzida (UTR) (IRSHAD et al., 2006). Apesar da grande divergência de TTV e TLMV em regiões codificantes do genoma, três áreas de conservação foram identificadas na parte UTR que contém promotores e sítios de splicing (OKAMOTO et al., 2000).

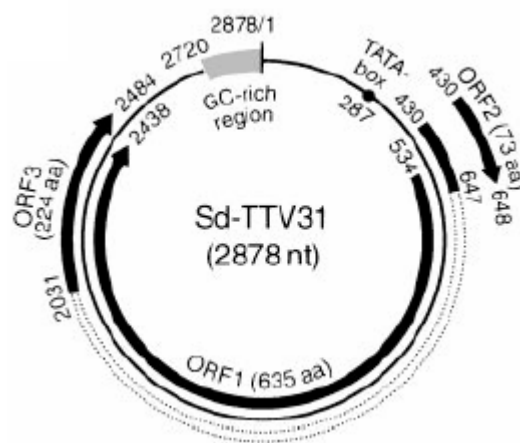


Figura 2. Organização genômica de TTV suíno. As setas fechadas representam as ORFs (ORF1-3). A caixa aberta localizada no centro da ORF3 representa uma área correspondente a um intron no mRNA mais curto. A caixa sombreada indica a região rica em GC e o ponto representa a posição do TATA Box. (OKAMOTO et al., 2002).

2.5.2 Patogenia

Embora não se saiba exatamente em que células o TTV se replica, o DNA de TTV tem sido detectado freqüentemente em células mononucleares do sangue periférico (OKAMURA et al., 1999; OKAMOTO et al., 1999) e também em células hematopoiéticas da medula óssea (KANDA et al., 1999; KIKUCHI et al., 2000). O TTV, assim como o circovírus e o parvovírus, necessitam de células se multiplicando ativamente para a sua replicação (BERNS et al., 1990; ALLAN et al., 1994). Formas replicativas intermediárias de fita dupla de TTV foram relatadas no fígado e em células da medula óssea (OKAMOTO et al., 2000).

O TTV não tem sido cultivado *in vitro* e pouco ainda se sabe a respeito deste vírus. Uma linhagem celular para isolamento e cultivo deste vírus poderia acelerar significativamente a investigação do mesmo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Contribuir para o conhecimento da patogenia da SMDS em suínos.

3.2 Objetivos específicos

Pesquisar possíveis associações entre a ocorrência de SMDS e outros agentes virais cujo genoma seja composto por DNA circular.

4 CAPÍTULO 1

4.1 Detection of anelloviruses in sera pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome.

Authors:

T.F. Teixeira¹, D. Dezen¹, S.P. Cibulski¹, C.L. Holz¹, S.P.M.B. Caixeta¹, J.R. Silva¹, C. Cerva¹, F.A.M. Rijsewijk², A.C. Franco², S. Borowski¹, A. Braga¹, D.E.S.N. Barcellos³, P.M. Roehe^{1,2*}.

1. Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, CEP: 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil.

2. Laboratório de Virologia, DM-ICBS/ UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária/ UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000 - Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90 001 970. Tel.: (51) 3481.3711. Fax: 51.3481 33 37.

*E-mail address: proehe@gmail.com

Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a member of *Circoviridae* family; the virus is associated to the condition named postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). However, PCV2 has consistently been shown to be necessary but not sufficient for the induction of PMWS, since other factors seem necessary for the development of the disease. Some authors suggest that PCV2 may not be the only agent involved in the pathogenesis of PMWS. In this study we have conducted a search for circular single stranded DNA genomes, which might bear association with the occurrence of PMWS. In order to achieve that, multiply primed rolling circle amplification (MPRCA) was employed. Sera from 67 pigs with clinical signs of PMWS (40-120 days old) from 6 different pig herds and 63 healthy pigs (3-19 months old) from 7 different herds were examined. Restriction enzyme analysis profiles consisting of 3 bands (3.2 kb, 1.7 kb, 1.2 kb) was detected in sera of 85.7% (54/63) healthy pigs, against 15.0% (10/67) of pigs with clinical signs of PMWS. Some of these DNA fragments were sequenced and identified as parts of anellovirus genomes. Fragments of more than one anellovirus genome were found in the sequenced sample, including a swine anellovirus sequence not previously described. This preliminary data suggests that possible anelloviruses may be present more often in PMWS-negative pigs than in pigs with PMWS. In addition, a novel nucleotide sequence of swine anellovirus was revealed. Further studies are needed to confirm the relationship between possible anelloviruses and the occurrence of PMWS.

Keywords: PCV2, PMWS, co-infection, TTV, anellovirus

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a member of the genus *Circovirus* within the family *Circoviridae* (Allan et al., 1995). PCV2 is a small, non-enveloped virus, single-stranded circular DNA genome (Hamel et al., 1998; Chun et al., 2004). The virus was first described in 1998 after isolation from tissues taken from affected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Ellis et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998). PCV2 is necessary, although it seems not to be the sole responsible for PMWS (Allan et al., 2000). The virus has been associated to other conditions such as reproductive disorders (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001), porcine dermatitis/nephropathy syndrome (PDNS) (Rosell et al., 2000), porcine respiratory disease complex (PRDC) (Thacker and Thacker, 2000), proliferative and necrotising pneumonia (PNP) (Pesch et al., 2000) and congenital tremor (Stevenson et al., 2001). None of these, however, has been so economically significant for swine production as PMWS.

Under experimental conditions, the reproduction of PMWS in pigs infected with PCV2 alone has been difficult to achieve; PCV2-infected pigs developed only mild to moderate PMWS specific lesions (Balasch et al., 1999; Krakowka et al., 2000). Although PCV2 has consistently been shown to be necessary for the development of PMWS, there are several reports suggesting that PCV2 may not be the only agent involved in the pathogenesis of PMWS; thus, other factors may be necessary for the development of the condition (Allan et al., 2000c; Krakowka et al., 2000; Harms et al., 2001).

Recently, the association between porcine Torque teno virus (TTV) and PCV2 in animals with and without PMWS was reported (Kekarainen et al., 2006). TTV was first detected in 1997 in the blood of a Japanese patient with post-transfusion hepatitis of unknown etiology (Nishizawa et al., 1997). TTV is a small (30-32 nm) non-enveloped virus with a single-stranded circular DNA genome of negative polarity (Itoh et al., 2000; Okamoto et al., 2002). Because of the circular genome, TTV was initially classified in the *Circoviridae* family, along with PCV1 and PCV2, psittacine beak and feather disease virus, chicken anaemia virus and TTV-like minivirus. However, it was recently reclassified into a novel floating genus called *Anellovirus* (Biagini et al., 2005).

The aim of the present study was to investigate the presence of possible viral pathogens with circular DNA genomes that might be related to PMWS. For this, a

technique called “Multiply Primed Rolling Circle Amplification” (MPRCA) was employed. Here is reported an apparently inverse correlation between the presence of possible anelloviruses and the occurrence of PMWS. Besides, the sequence of an anellovirus of a previously unreported type is presented.

Materials and methods

Sera samples

Sera samples from 67 pigs with clinical signs and macroscopic lesions of PMWS and from 63 healthy pigs (controls) from 13 different pig herds from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, were used in this study. The pigs of the case group were 40-120 days old, whereas pigs from the control group were 3-19 months old.

DNA extraction and detection by rolling circle amplification (RCA)

Viral DNA was extracted from 500 µl sera as described previously (Niel et al. 1994). MPRCA was performed as described by Niel et al. (2005) with some modifications. Briefly, two µl of serum DNA were denatured for 4 min at 94 °C and cooled on ice. Twenty-three µl of a previously prepared solution containing 1.5 mM of each dNTPs (Invitrogen), 6.2 mM of random hexanucleotides exonuclease-resistant (Fermentas), 2U of phi29 DNA polymerase and 2.5 µl reaction buffer [50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM dithiothreitol] were added. The amplification solution was incubated for 18 h at 30 °C, followed by 10 min at 65 °C to inactivate the enzyme.

Restriction enzyme digestion analysis

The amplification products were digested with *Eco* RI and *Bam* HI (Invitrogen) enzymes. The DNA fragments obtained were separated by 1% agarose gel electrophoresis and visualized by UV light exposure after ethidium bromide staining.

DNA fragments that had to be cloned were purified using a commercial kit (GFX™ Purification Kit; Amersham Biosciences).

Cloning

The purified DNA of three fragments of sample 17a digested with *Bam* HI, two fragments of sample 2516 digested with *Bam* HI and two fragments of sample 2516 digested with *Eco* RI were quantified using Kodak Digital Science 1D™ software, ligated into vector pCR2.1 (Invitrogen) and the obtained ligation products were used to transform TOP10 *Escherichia coli* cells (Invitrogen). After transformation the bacteria were incubated on agar plates containing 50 µg/ml of ampicillin. Bacteria carrying recombinant plasmids were grown over-night. Plasmids were purified using the commercial kit (GFX™ Purification Kit; Amersham Biosciences) for sequencing.

DNA sequencing and sequence analysis

The cloned fragments were sequenced in MegaBACE 500, each strand at least two times, with the Dynamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) following the manufacturer's protocol. The primers used for the sequencing were universal M13F, universal M13R and those described in Table 1. The obtained sequences were assembled in the SeqMan program of the DNASTAR software package. Using the ClustalW 1.6 program the obtained sequence was aligned with complete genome sequences of TTV, available from NCBI GenBank (AB076001, AY823990, AY823991, AY823988, AY823989). The construction of phylogenetic tree was carried out using Neighbor-Joining, Kimura-2 parameter and 1000 bootstrap within the MEGA3.1 package. Alignments of the amino acid sequences encoded by the open reading frames were performed using the MegAlign 5.00 expert sequence analysis software of DNASTAR.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with χ^2 tests (Epi Info version 3.4.1) to compare the proportion of standard fragments found in restriction enzyme digestion within the case group and within the control group. The level of significance was set to $p \leq 0.05$.

Results

Restriction endonuclease digestion of MPRCA products

All sera samples gave rise to amplification products of high molecular weight. After digestion with *Bam* HI a consistent pattern (named “Pattern 1”) was detected (Fig. 1). Such a pattern consisted of three fragments of 3.2 kb, 1.7 kb and 1.2 kb respectively and was detected in 85.7% (54/63) of healthy pigs and in 15.0% (10/67) of PMWS-affected pigs. Three additional distinct patterns (“2, 3 and 4”) were observed when digested with the same enzyme. Pattern 2 was represented by two fragments of 1.7 kb and 1.2 kb detected in 3.2% (2/63) of healthy pigs and in 1.5% (1/67) of PMWS-affected pigs (Fig. 1). Pattern 3 was represented by one fragment of 3.2 kb detected in 7.9% (5/63) of healthy pigs and in 12.0% (8/67) of PMWS-affected pigs; Pattern 4 was represented by 2 fragments of 3.2 kb and 2.4 kb; these were detected in 8.9% (6/67) of the PMWS-affected pigs (Fig. 1). Pattern 1 (three fragments) was significantly more frequent in sera of healthy pigs than in sera from PMWS-affected pigs ($p < 0.001$). On the other hand, no statistically significant association could be drawn between the presence of patterns 2, 3 and 4 and the PMWS status of pigs (Table 2).

When the MPRCA products that gave a “Pattern 1” after a *Bam* HI digestion were digested with *Eco* RI (Fig. 2) the sizes of the restriction endonuclease fragments showed considerable variation, despite the constant pattern observed with *Bam* HI. This implies that the sera that show the *Bam* HI “Pattern 1” may harbor similar, but not totally identical viral genomes.

Cloning strategy and sequence analysis

One of the samples (2516) was chosen to be fully sequenced. Sequence of Clones 2516A and 5C originated from fragments digested with *Bam* HI and *Eco* RI enzymes respectively (Fig. 3) were overlapping (Fig. 4). The obtained nucleotide sequence has a higher degree of similarity with Sd-TTV31 sequence in GenBank (AB076001) than to any other TTV sequence present in the database. Despite the fact that the sequence here introduced is not complete, the total size could be estimated to be 2.9 kb. Based on the comparison between 2516 and SdTTV-31 sequences, it can be estimated that about 95 % of the 2516 genome has been sequenced and that the non-sequenced parts encompass nucleotides 385-481 and 2604-2890 (Fig. 5).

The genomic organization of the 2516 genome is similar to that of SdTTV-31 and TTV-1p. Like the other swine TTV viruses the 2516 genome encodes three ORFs and the similarities with other TTV ORFs are shown in Table 3. Unfortunately, the beginnings of ORFs 2 and 3 of 2516 are not yet determined. Nevertheless, phylogenetic analysis revealed that the 2516 is similar to TTV genogroup 1 viruses, being more closely related to sd-TTV31, an isolate from Japan, than to TTV-1p, an isolate from Brazil (Rio de Janeiro) (Fig. 6).

Three other fragments, all resulting from sample 17a, were also cloned and sequenced (Fig. 1). No homology was found on nucleotide or protein level with the sequence from clone 17aA. Clone 17aB showed 80% of similarity with Sd-TTV31 and less with TTV-1p while clone 17aC showed a very high similarity (98%) with TTV-1p and less with Sd-TTV31. Implying that sample 17a contained the genomes of two anelloviruses, both belonging to Genogroup 1.

Discussion

Porcine anelloviruses have not to date been associated with any particular swine disease. Likewise, its human counterparts, TTVs and alike, have not been linked to any particular disease, though these have been tentatively associated to a number of pathologies (Gergely et al., 2005; Haramoto et al., 2005; Kasirga et al., 2005; Hino and

Miyata, 2007). Nevertheless, porcine anelloviruses have been detected in proportions that vary from 66.2 % in swine sera from six different countries (McKeown et al., 2004) to 90.5% of porcine plasma samples (Brassard et al., 2008). These studies and the findings of others (Bigarré et al., 2005; Kekarainen et al., 2006, Martelli et al., 2006) point to a high prevalence of porcine anelloviruses in domestic pigs.

The apparent ubiquitous nature of porcine anelloviruses in swine herds and the lack of geographical clustering of the isolates have been suggested to be related to a worldwide dissemination of the virus through contaminated swine vaccines (McKeown et al., 2004). However, this would be in contrast with the anellovirus diversity found in a number of studies (Bigarré et al., 2005; Niel et al., 2005; Kekarainen et al., 2006; Martelli et al., 2006), including this one.

A positive correlation between the occurrence of porcine TTV and PMWS has been reported; porcine TTV infections with genogroup 2 viruses were more prevalent in pigs affected by PMWS, than clinically healthy pigs (Segalés et al., 2005; Kekarainen et al., 2006). In the present study, we found a negative correlation between the presence of a certain *Bam*HI digestion pattern (pattern 1) of MPRCA products that in one case has been shown to be the genome of a novel porcine TTV virus and the occurrence of PMWS. This *Bam*HI “pattern 1” is present in a significantly larger proportion (88.9%) of healthy pigs than in pigs with PMWS (16.4%).

Other cleavage patterns of DNA were obtained after restriction enzyme of MRCPA amplified products; however, those were not found in consistently significant differences between PMWS affected and unaffected pigs. The restriction enzyme patterns obtained with distinct enzymes also revealed that possibly more than one porcine anellovirus may be present in PMWS-negative pigs, since digestions of these samples with another enzyme gave rise to distinct restriction enzyme patterns. As we have not been able to sequence the full length of DNA fragments obtained by MPRCA/restriction enzyme digestion, these findings only allow speculation in that there is a great chance that the similar amplification profiles obtained in fact correspond to porcine anellovirus genomes.

These results revealed the presence of possibly more than one anelloviruses in a particular pig, indicating a mixed infection.

Although the PMWS-unaffected control pigs used in this study were older than the PMWS-affected pigs, Martelli et al. (2006) observed a significantly higher prevalence of anellovirus in weaners (57.4%) than in finishing (22.9%) herds might also

suggest that younger pigs could be more susceptible to porcine anellovirus infection than older animals. However, it may also be that the finding of anelloviruses in such older animals may be a natural consequence of longer periods of exposure to such agents in the environment and may bear no relationship with the development of PMWS. Further studies are needed to investigate aged matched groups in order to evaluate more precisely the occurrence of anelloviruses in PMWS-affected and unaffected pigs.

In summary, the results presented here indicate that porcine anelloviruses seem to be present in significantly higher proportions in sera of healthy pigs than in sera of PMWS-affected pigs. Further investigations are urged to confirm the nature of the amplified DNA in an attempt to confirm this correlation and understand the possible interactions between PCV2 and these agents and its significance on the pathogenesis of PMWS.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and FAPERGS. P.M. Roehle is a CNPq 1A research fellow.

References

- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
- Allan, G.M.; McNeilly, F.; Cassidy, J.P.; Reilly, G.A.C.; Adair, B.; Ellis, J.A.; McNulty, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet. Microbiol.* 44, 49–64.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000b. Experimental infection of colostrum deprived pigs with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 145, 2421-2429.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., 2000c. Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet. Rec.* 147, 170–171.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Meehan, B.M., Ellis, J.A., Connor, T.J., McNair, I., Krakowka, S., Kennedy, S., 2000a. A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 47, 81-94.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999b. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1–11.
- Balasz, M., Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A., Planadurán, J., 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 121(2), 139-48.
- Biagini, P., Todd, D., Bendinelli, M., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., (2005). Anellovirus. In: Fauquet, C.M.; Mayo M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. (Eds.). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 335–341. London: Academic Press.
- Bigarré, L., Beven, V., de Boisséson, C., Grasland, B., Rose, N., Biagini, P., Jestin, A., 2005. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *J. Gen. Virol.* 86, 631–635.
- Brassard, J., Gagné, M.J., Lamoureux, L., Inglis, G.D., Leblanc, D., Houde, A., 2008. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. *Vet. Microbiol.* 126(1-3), 271-6.
- Choi, C., Chae, C., 2000. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 123, 302–305.

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Tood, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39(1), 44-51.

Gergely, Jr., P., Blazsek, A., Danko, K., Ponyi, A., Poor, G., 2005. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1050, 304–313.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol.* 72(6), 5262-7.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Nakajima, E., Ohgaki, S., 2005. One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. *Water Res.* 39, 2008–2013.

Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. 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.* 38, 528–539.

Hino, S., Miyata, H., 2007. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.* 17, 45–57.

Itoh, Y.; Takahashi, M.; Fukuda, M.; Shibayama, T.; Ishikawa, T.; Tsuda, F.; Tanaka, T.; Nishizawa, T.; Okamoto, H., 2000. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 718–724.

Kasirga, E., Sanlidag, T., Akcali, S., Keskin, S., Aktas, E., Karakoc, Z., Helvacı, M., Sozen, G., Kuzu, M., 2005. Clinical significance of TT virus infection in children with chronic hepatitis B. *Pediatr. Int.* 47, 300–304.

Kekarainen, T., Sibila, M., Segales, J., 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87, 833–837.

Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol.* 38, 31-42.

Krakovka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. 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.* 37(3), 254-63.

Krakovka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. 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* 37, 254–263.

Kyriakis, S.C., Saoulidis, K., Lekkas, S., Miliotis, C.C., Papoutsis, P.A., Kennedy, S., 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol.* 126, 38–46.

Martelli, F., Caprioli, A., Di Bartolo, I., Cibin, V., Pezzotti, G., Ruggeri, F.M., Ostanello, F., 2006. Detection of swine torque teno virus in Italian pig herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53(5), 234-8.

McKeown, N.E., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2004. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet. Microbiol.* 104, 113–117.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Tood, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol.* 79(9), 2171-2179.

Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 36(9), 2535-2541.

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

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92–97.

O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.* 42, 551–553.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., Yoshikawa, A., 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTV) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTV in primates and tupaias. *J. Gen. Virol.* 83, 1291–1297.

Pesch, S., Schmidt, U., Ohlinger, V.F., 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society*, p. 581.

Pogranichniy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Sorden, S.D., Daniels, M., 2002. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 14(6), 449-56.

Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arriola, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146, 40–43.

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

Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, L., 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 57–62.

Thacker, B., Thacker, E., 2000. The PRDC battle continues. *Pig Prog.*, 16–18.

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., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 530–532.

Anexos

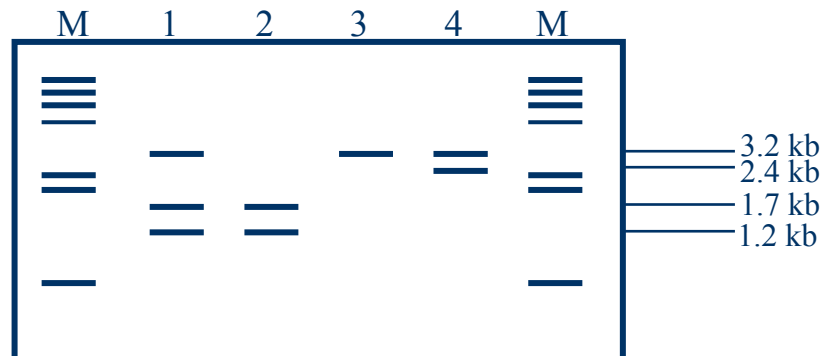


Fig. 1. PMRCA products of samples digested with *Bam* HI. Lane 1: Lambda x *Hind*III marker, Lane 2: fragments of endonuclease restriction of DNA extracted from sera of PMWS-negative pigs. Represents “pattern 1”. Lane 3: fragments of endonuclease restriction of DNA extracted from sera of PMWS-affected pigs. Represents “pattern 2”. Lane 4: fragments of endonuclease restriction of DNA extracted from sera of PMWS-affected pigs. Represents “pattern 3”. Lane 5: fragments of endonuclease restriction of DNA extracted from sera of PMWS-affected pigs. Represents “pattern 4”.

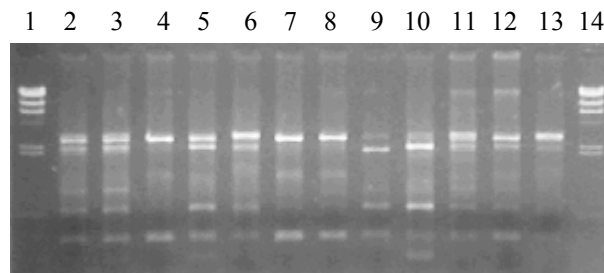


Fig. 2. Electrophoresis of MPRCA products digested with *EcoRI*. Lanes 1,14: Lambda x *HindIII* marker, 2-13: endonuclease restriction profile performed on DNA extracted from sera of PMWS-negative pigs.

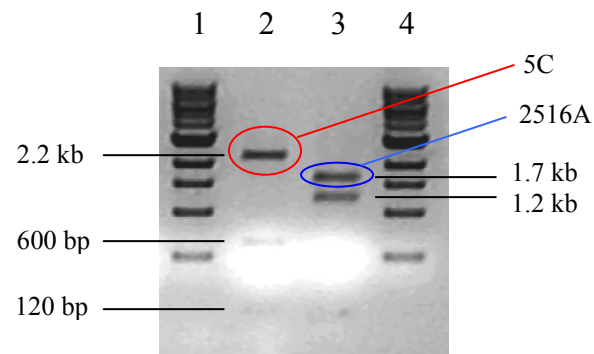


Fig. 3. TTV-2516 digestion. Lanes 1 and 4: 1 kb marker, 2: TTV-2516 digested with *Eco*RI and 3: TTV-2516 digested with *Bam*HI.

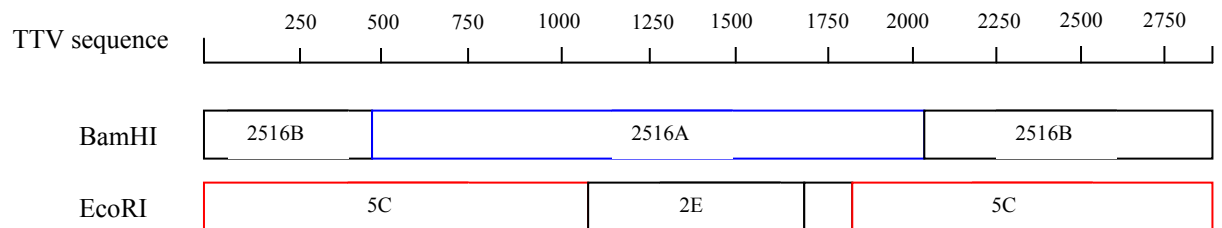
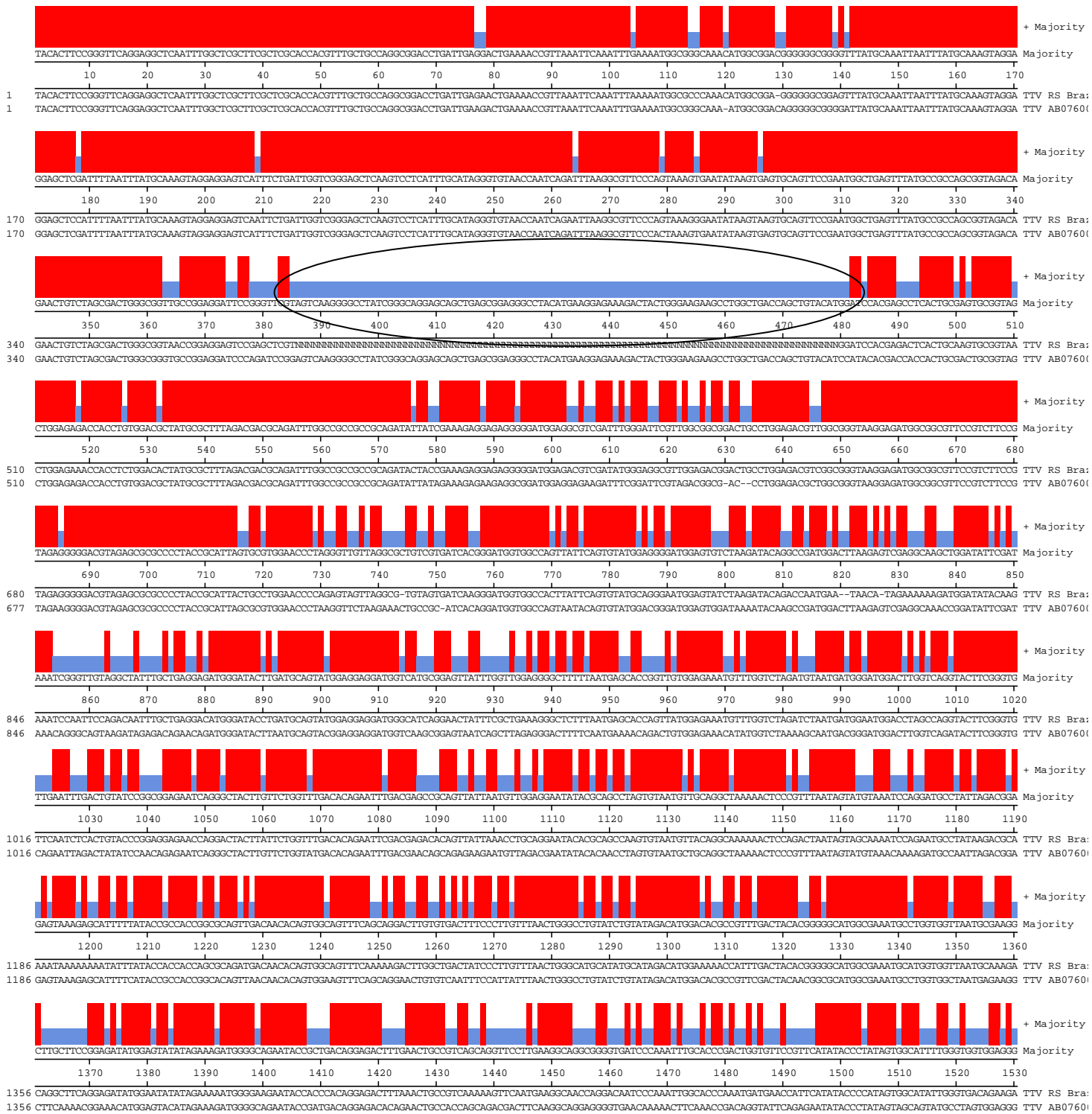


Fig. 4. TTV-2516 cloning strategy. The upper line indicates the complete TTV genome. Boxes indicate the fragments after a *Bam*HI or an *Eco*RI digestion, respectively. The fragments were first sequenced using M13 primers. The sequences of red boxes are overlapping and will be sequenced using specifically selected primers to complete the sequence.



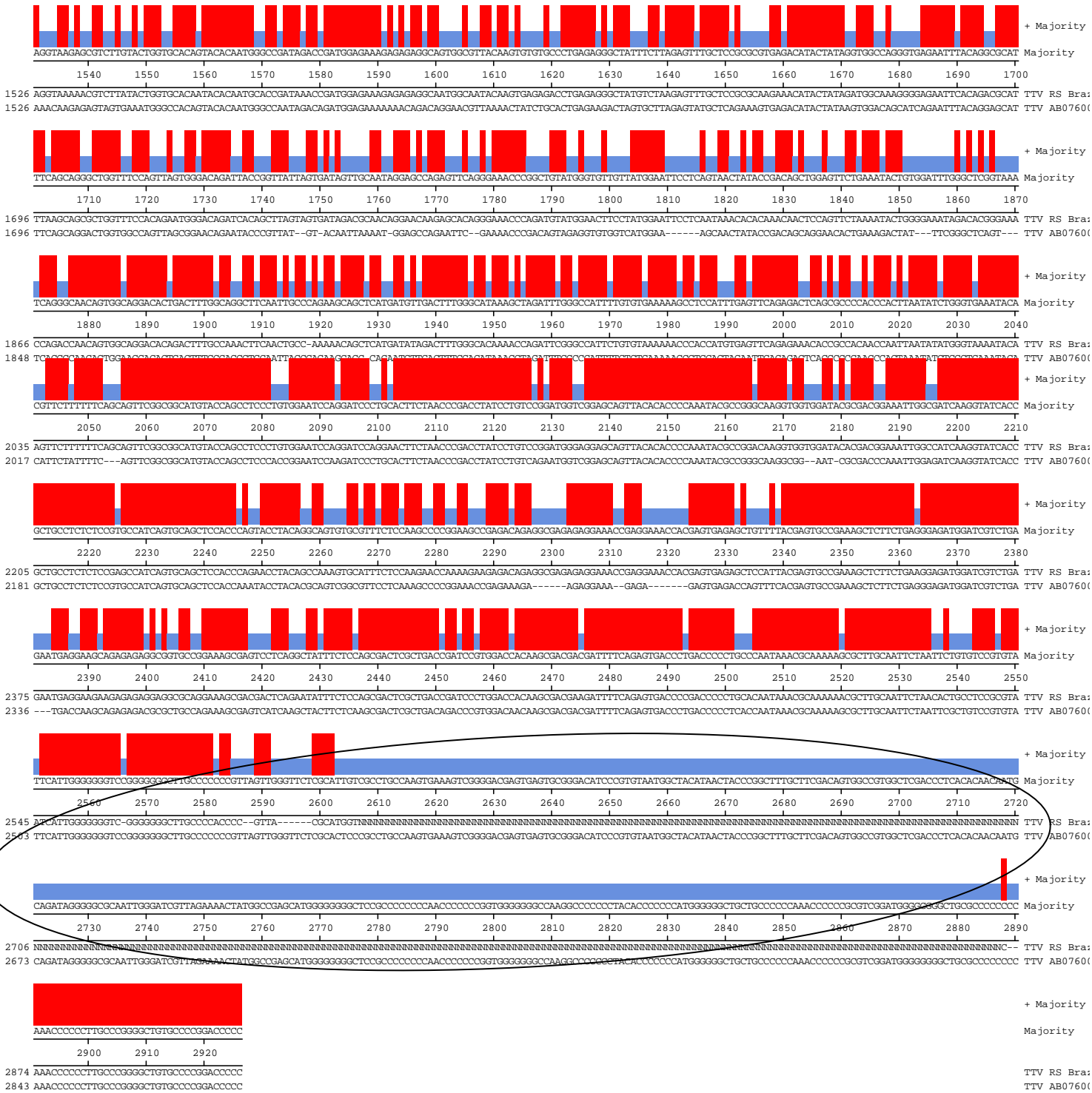


Fig. 5. Comparison between Sd-TTV31 and TTV-2516 sequence. Circled fragments indicates the non-sequenced regions of TTV-2516.

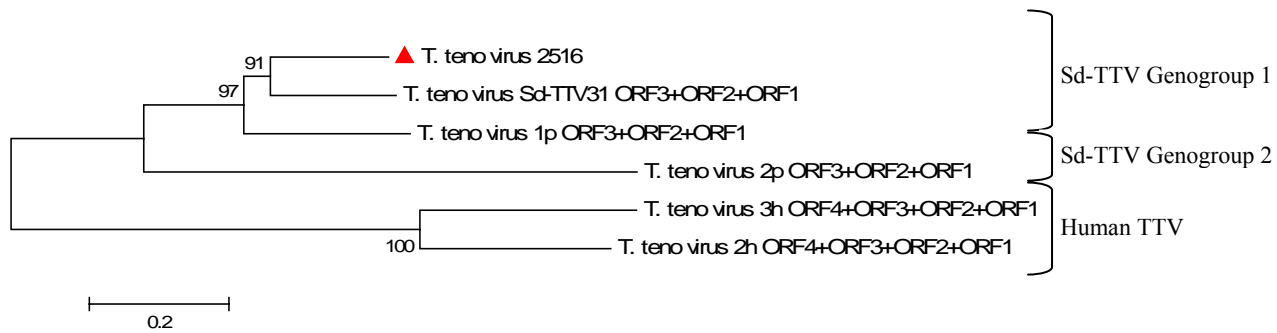


Fig. 6. Neighbour-joining phylogenetic tree constructed based on the entire nucleotide sequences of TTV genome (GenBank accession numbers AB076001, AY823990, AY823991, AY823988, AY823989).

Primer	Sequence (5'-3')
TTV 001	TAAGGCGTTCCCAGTAAAGG
TTV 002	TTCCAGGCAGTAATGCGGTA
TTV 003	GACGAAGATTTTCAGAGTGAC
TTV 004	GTTCTCAATCAGGTCCGCCT
TTV 005	GTCACTCTGAAAATCTTCGTC
TTV 006	CTCTCTCGCCTCTGTCTCTT
TTV 007	GCATGGTGGTTAATGCAAAGAC
TTV 008	CGTCTTATACTGGTGCACAATAC
TTV 009	GTCTTTGCATTAACCACCATGC
TTV 010	ATGAGCACCAGTTATGGAGA

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used to sequence the TTV genome completely.

	PMWS-affected pigs (67)	Healthy pigs (63)
Pattern 1	15.0 % (10)	85.7 % (54)
Pattern 2	1.5 % (1)	3.2 % (2)
Pattern 3	12.0 % (8)	7.9 % (5)
Pattern 4	8.9 % (6)	0.0 % (0)
No pattern	49.2 % (33)	0.0 % (0)
Not digested	13.4 % (9)	3.2 % (2)

Table 2. Percentage of patterns between PMWS-affected pigs and healthy pigs.

	TTV-2516		
	ORF1	ORF2	ORF3
Sd-TTV31	60 %	52.8 %	62.5 %
TTV-1p	48.5 %	36.1 %	42.1 %

Table 3. Comparison between ORFs of TTV-2516 and other ORFs. The values indicate the percentage of identity between the amino acids of the ORFs 2516 and the corresponding ORFs of either Sd-TTV31 or TTV-1p.

5 CONCLUSÕES

- Após amplificação com phi29 e digestão enzimática com a enzima *Bam* HI, foram encontrados determinados perfis de bandas de DNA nos soros dos animais. Um destes perfis encontrados (“Padrão 1”) apresentou uma diferença significativa entre os grupos de suínos saudáveis e com SMDS.

- O “Padrão 1” foi considerado sugestivo da presença de um ou mais anelovírus e foi detectado em uma alta percentagem (85,7%) de animais que não apresentavam SMDS. O mesmo padrão foi encontrado em uma proporção significativamente inferior (15,0%) em animais com SMDS.

- O sequenciamento de uma das bandas de DNA obtidas com a amostra 2516 (“Padrão 2”) mostrou que este DNA é derivado de um TTV suíno, um anelovírus do genótipo 1, porém com uma seqüência diferente das descritas anteriormente. Este padrão caracterizado por fragmentos de tamanho 1,7 kb e 1,2 kb foi detectado em 3,2% dos animais saudáveis e 1,5% dos animais com SMDS.

- O seqüenciamento dos fragmentos de DNA da amostra denominada 17a (“padrão 1”) caracterizada por bandas de tamanho aproximado de 3,2 kb, 1,7 kb e 1,2 kb permitiu a identificação da presença de dois anelovírus distintos, porém do mesmo genogrupo, na mesma amostra, indicando, pelo menos neste caso, uma infecção mista. Provavelmente, a banda de 3,2 kb corresponde a um terceiro vírus. Entretanto, isso precisa ser confirmado futuramente através de sequenciamento.

- É possível que outros genomas virais tenham sido amplificados neste trabalho, pois a grande maioria dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição não foram seqüenciados e, portanto, ainda não se sabe exatamente quantas variantes de possíveis anelovírus suíno temos presente nas amostras analisadas. Pelas pequenas diferenças observadas nos tamanhos dos segmentos amplificados, pode-se especular que deve haver vários outros agentes com genomas similares nas outras amostras.

- O presente estudo mostra que a técnica de amplificação por círculo rolante com múltiplos primers (ACRMP) se mostrou útil para a identificação de novos vírus com genoma de DNA circular, embora não tenha sido determinada a efetiva sensibilidade do método nas condições deste estudo.

- Mais estudos são necessários para avaliar possíveis interações destes agentes com a ocorrência de SMDS.

REFERÊNCIAS

ABE, K.; INAMI, T.; ISHIKAWA, K.; NAKAMURA, S.; GOTO, S. TT virus infection in nonhuman primates and characterization of the viral genome: identification of simian TT virus isolates. **Journal of Virology**, v. 74, p. 1549–1553. 2000.

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

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

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ADAIR, B.M. Infection of leucocyte cell cultures from different species with porcine circovirus. **Veterinary Microbiology**, v.41, p. 267-279. 1994a.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p. 3–10. 1998.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; MOFFETT, D.; MALONE, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v.146, p. 711–712. 2000.

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

ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; MCNAIR, I.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; FOSSUM, C.; WATTRANG, E.; WALLGREN, P.; ADAIR, B. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p. 553–560. 2003.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p. 1–11. 1999.

ALLAN, G.M.; PHENIX, K.; TODD, D.; MCNULTY, M. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p. 17–26. 1994b.

BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURAN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p. 139–148. 1999.

BARBOSA, C.N. Circovirus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos. 2005. 96p. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

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

BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; MAGGI, F.; FORNAI, C.; FREER, G.; VATTERONI, L. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 98–113. 2001.

BERSANO, J.G.; CASTRO, A.M.M.G.; BRANDÃO, P.E.; VILLALOBOS, E.M.C.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; RUIZ, V.L.A.; LEOMIL, H.; CATROXO, M.H.B.; MONTEIRO, R.M.; OGATA, R.A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção de infecção mista por circovírus suíno (PCV) e coronavírus em suíno: relato de caso. In: **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, p.61-65, 2003. Suplemento 3. Trabalho apresentado na Reunião Anual do Instituto Biológico, 16., 2003, São Paulo. Resumo expandido 129.

BIAGINI, P.; TODD, D.; BENDINELLI, M.; HINO, S.; MANKERTZ, A.; MISHIRO, S.; NIEL, C.; OKAMOTO, H.; RAIDAL, S. (2005). Anellovirus. In: FAUQUET, C.M.; MAYO M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). **Virus Taxonomy**, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 335–341. London: Academic Press.

BIAGINI, P.; UCH, R.; BELHOUCHE, M.; ATTOUI, H.; CANTALOUBE, J.F.; BRISBARRE, N.; DE MICCO, P. Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. **The Journal of General Virology**, v.88, n.10, p. 2696-701. 2007.

BIGARRÉ, L.; BEVEN, V.; DE BOISSÉSON, C.; GRASLAND, B.; ROSE, N.; BIAGINI, P.; JESTIN, A. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 631–635. 2005.

BOGDAN, J.; WEST, K.; CLARK, E.; KONOBY, C.; HAINES, D.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. **The Canadian Veterinary Journal**, v.42, n.7, p. 548-550. 2001.

BOLIN, S.R.; STOFFREGEN, W.C.; NAYAR, G.P.; HAMEL, A.L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-

derived, colostrumdeprived piglets with type 2 porcine circovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 185–194. 2001.

CASTRO, A.M.M.G.; MORENOA.M.; CORTEZ, A.; RUIZ, V.L.A.;LEOMIL, H.; DOTO, D.S.; RICHTZENHAIN, L.J. Infecção múltipla com circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), Bordetella bronchiseptica e Mycoplasma hyopneumoniae em suínos com sinais clínicos da síndrome de refugagem pós-desmame (PMWS). In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 15, 2003, São Paulo. **Resumos...2002a**, v.69, p.34.

CASTRO, A.M.M.G.; RUIZ, V.L.A.; CASTRO, JR F.G.; BERSANO, J.G.; MORENO, A.M.; CORTEZ, A. Detecção e diferenciação de circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes Estados brasileiros e em suínos do Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...2003**, p.107-108.

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

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, v.168, p. 41-49. 2004.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**, v.169, n.3, p.326-336, 2005.

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. 452–459. 2003.

CHEUNG, A.K. Rolling-Circle Replication of an Animal Circovirus Genome in a Theta-Replicating Bacterial Plasmid in *Escherichia coli*. **Journal of Virology**, p. 8686–8694, 2006.

CHEUNG, A. K. Mutational analysis of the direct tandem repeat sequences at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 1. **Virology**, v.339, p. 192–199. 2005.

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

CHIARELLI, O.; CASTRO, L.A.; SILVA, F.M.F.; BONFÁ, G.; SILVA JÚNIOR, A.; MORAES, M.P.; ALMEIDA, M.R. Isolation of porcine circovirus type 2 (PCV2) in animals from Espírito Santo state. In: National Meeting of Virology, 16, 2005, Salvador. **Anais...2005**, p.99.

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

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

CHOI J, STEVENSON GW, KIUPEL M, HARRACH B, ANOTHAYANOTHA L, KANITZ CL, MITTAL S Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.66, p. 217-224. 2002.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; DAHMER, A.; ZANELLA, E.L. Detecção de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em sêmen de suínos. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...2003b**, p.97-98.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; FERNANDES, L.T.; BASSI, S.S.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M.F. Ocorrência de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em suínos ou materiais com suspeita clínica de síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) enviados para diagnóstico. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...2003a**, p.95-96.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização de circovirus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 10, 2001, Porto Alegre. **Anais...2001**, p.97-98.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORES, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1988 in Brazil. **Ciência Rural**, v.36, p.1480-1485. 2006.

CLARK. E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, 1997. p. 499–501.

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

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

DULAC, G.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.53, p. 431–433. 1989.

EDWARDS, S.; SANDS, J. Evidence of porcine circovirus infection in British pigs. **Veterinary Record**, v.134, p. 680–681. 1994.

ELLIS, J.A.; KRAKOWA, S.; ALLAN, G.; CLARK, E.; KENNEDY, S. The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection has expanded since 1987: an alternative perspective. **Veterinary Pathology**, v.36, n.3, p. 262-265. 1999a.

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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p. 3–14. 1999b.

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

FERNANDES L.T., CIACCI-ZANELLA J.R., TROMBETTA C., SOBESTIANSKY J., OLIVEIRA S. & BRITO L.A.B. Avaliação da patogenicidade do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) isolado no Estado de Santa Catarina através de coinfeção experimental com parvovírus suíno. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...**2003, p.89-90.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; DRIEMEIER, D.; MORES, N.; ZANELLA, J. Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.1, p. 39-53. 2005.

GRESHAM, A.; GILES, N.; WEAVER, J. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. **Veterinary Record**, v.147, p. 115. 2000.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and molecular life Science**, v.56, p.313-329. 1999.

HÁ, Y.; CHAE, C. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. **Veterinary Record**, v.156, p. 383–384. 2005.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**, v.72, n.6, p. 5262-7. 1998.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p. 105–140. 2000.

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

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

HARDING, J.C.S.; CLARK, E.G.; STROKAPPE, J.H.; WILLSON, P.I.; ELLIS, J.A. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - Epidemiology and Clinical Presentation. **Swine Health and Production**, v. 6, n.6, p. 249-254. 1998.

HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.R.; LAGER, K.M.; MOROZOV, I.; PAUL, P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v.38, p. 528-539. 2001.

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

HINES, R.K.; LUKERT, P.D. Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners, Chicago, p.344-345. 1994.

HINES, R.K.; LUKERT, P.D. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. **Swine Health and Production**, v.3, n.2, p. 71-73. 1995.

HINRICHS, U.; OHLINGER, V.F.; PESCH, S.; WANG, L.; TEGELER, R.; DELBECK, F.E.J.; WENDT, M. First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. **Tierärztliche Umschau**, v.54, p. 255-258. 1999.

HORNER, G.W. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. Surveillance, Wellington, v.18, n.5, p. 23. 1991.

IRSHAD, M.; JOSHI, Y.K.; SHARMA, Y.; DHAR, I. Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.32, p. 5122-5134. 2006.

ITOH, Y.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, M.; SHIBAYAMA, T.; ISHIKAWA, T.; TSUDA, F.; TANAKA, T.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 718-724. 2000.

JOHNE R, WITTIG W, FERNÁNDEZ-DE-LUCO D, HÖFLE U, MÜLLER H. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. **Journal of Virology**, 2006 Apr;80(7):3523-31

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

KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 833-837. 2006.

KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine

circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p. 9–24. 2000.

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

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

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

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

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v.155, p. 489–492. 2004.

KIM, J.H.; LYOO, Y.S. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. **Journal of Veterinary Science**, v.3, n.1, p.31-39. 2002.

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

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; 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. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 254–263. 2000.

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

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

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

LAVAL, A. SMDS. Worldwide epidemiological review and updated situation in France and United Kingdom. In: Merial (ed). SMDS and PCV2 Diseases: From research back to the field again. Hamburg: 5th Merial, 2004, p. 47-56.

LEARY, T.P; ERKER, J.C.; CHALMERS, M.L.; DESAI, S.M.; MUSHAHWAR, I.K. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2115–2120. 1999.

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

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

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

MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV 2) in weaned pigs: a sequential study. **Journal of Comparative Pathology**, v.123, p. 258–269. 2000.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, 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. **Veterinary Journal**, v.169, p. 454–456. 2005.

MANDRIOLI, L.; SARLI, G.; PANARESE, S.; BALDONI, S.; MARCATO, P.S. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.97, p. 25–37. 2004.

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. **Veterinary Microbiology**, v.98, p. 81–88. 2004.

MANKERTZ, A.; HATTERMANN, K.; EHLERS, B.; SOIKE, D. Cloning, and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. **Archives of Virology**, v.145, p. 2469–2479. 2000.

MANKERTZ, A.; HILLENBRAND, B. Analysis of transcription of porcine circovirus type 1. **The Journal of General Virology**, v.83, p. 2743-2751. 2002.

MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G.; BUHK, H.-J. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. **Journal of Virology**, v.71, p. 2562–2566. 1997.

McKEOWN, N.E.; FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; MENG, X.J. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. **Veterinary Microbiology**, v. 104, p. 113–117. 2004.

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. **Journal of General Virology**, v.79, p. 2171–2179. 1998.

MORENO, A.M.; CASTRO, A.M.M.G.; PAIXÃO, R.; CORTEZ, A.; DOTO, D.S.; LEOMIL, H.; BACARRO, M.R.; RICHTZENHAIN, L.J. Associação entre Circovírus suínos tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos, 2003, Goiânia. **Resumos...** Goiás, 2003. p. 101-102.

MUSHAHWAR, I.K.; ERKER, J.C.; MUERHOFF, A.S.; LEARY, T.P.; SIMONS, J.N.; BIRKENMEYER, L.G.; CHALMERS, M.L.; PILOT-MATIAS, T.J.; DEXAL, S.M. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 96, p. 3177–3182. 1999.

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. **Journal of General Virology**, v.81, p. 2281–2287. 2000.

NIEL, C.; DE OLIVEIRA, J.M.; ROSS, R.S.; GOMES, S.A.; ROGGENDORF, M.; VIAZOV, S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. **Journal of Medical Virology**, v. 57, p. 259–263. 1999.

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

NINOMIYA, M.; TAKAHASHI, M.; SHIMOSEGAWA, T.; OKAMOTO, H. Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. **Archives of Virology**, v.152, n.11, p. 1961-75. 2007.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; KONISHI, K.; YOSHIZAWA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, p. 92–97. 1997.

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

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; KATO, N.; UKITA, M.; IKEDA, H.; IIZUKA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Hepatology Research**, v.10, p. 1-16. 1998.

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; TAWARA, A.; PENG, Y.; TAKAHASHI, M.; KISHIMOTO, J.; TANAKA, T.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. **Virology**, v. 277, p. 368–378. 2000.

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; UKITA, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, M.; IIZUKA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. **Virology**, v. 259, p. 437–448. 1999.

OKAMOTO, H.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; TAWARA, A.; FUKAI, K.; MURAMATSU, U.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, A. Genomic characterization of TT viruses (TTV) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTV in primates and tupaia. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1291–1297. 2002.

OKAMURA, A.; YOSHIOKA, M.; KUBOTA, M.; KIKUTA, H.; ISHIKO, H.; KOBAYASHI, K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medical Virology**, v.58, p. 174-177. 1999.

OKUDA, Y.; ONO, M.; YAZAWA, S.; SHIBATA, I. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p. 107–114. 2003.

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, 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. **Journal of Virological Methods**, v.117, p. 75–80. 2004.

ONUKE, A.; ABE, K.; TOGASHI, K.; KAWASHIMA, K.; TANEICHI, A.; TSUNEMITSU, H. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, n.10, p. 1119-1123. 1999.

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

PENSAERT, M.B.; SANCHEZ, R.E.J.R.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.M.; NAUWYNCK, H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, p. 175–183. 2004.

PESCADOR, C.A.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histopatológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.105-106.

PINTO, F.F.; LOBATTO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; ROCHA, M.A.; BARBOSA, C.N. Detecção do circovírus suíno 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do Estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 11, 2003, Goiânia. **Anais...**2003, p.105-106.

POGRANICHNIY, R.M.; YOON, K.J.; HARMS, P.A.; SWENSON, S.L.; ZIMMERMAN, J.J.; SORDEN, S.D. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. **Viral Immunology**, v.13, p. 143–153. 2000.

RECTOR, A.; BOSSART, G.D.; GHIM, S.J.; SUNDBERG, J.P.; JENSON, A.B.; VAN RANST, M. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris* papillomavirus type 1. **Journal of Virology**, v.78, n.22, p. 12698-702. 2004.

RECTOR, A.; TACHEZY, R.; VAN DOORSLAER, K.; MacNAMARA, T.; BURK, R.D.; SUNDBERG, J.P.; VAN RANST, M. Isolation and cloning of a papillomavirus from a North American porcupine by using multiply primed rolling-circle amplification: the *Erethizon dorsatum* papillomavirus type 1. **Virology**, v.331, n.2, p. 449-56. 2005.

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

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

ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURÁN, J.; ROSSEL, C.; ELLERBROK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Porcine Circovirus 2. **Journal of Virology**, v.76, p. 3232-3239. 2002.

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

SAOULIDIS K., KYRIAKIS S.C., KENNEDY S., LEKKAS S., MILIOTIS CH.C., ALLAN G.M., BALKAMOS G.C. & PAPOUTSIS P.A. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in

pigs in Greece. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.49, n.4, p. 202-205. 2002.

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

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. Review. **Animal Health Research Reviews**, v.6, p. 119-42. 2005.

SEGALÉS J, DOMINGO M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **The Veterinary Quarterly**, v.24, n:3, p. 109-24. 2002.

SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; ESPUNA, E.; DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **Veterinary Record**, v.142, p. 483–486. 1998.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v.98, p. 137–149. 2004.

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

SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p. 405–408. 2003.

SIERRA, M. A., DE LAS MULAS, J.M.; MOLENBEEK, R.F.; VAN MAANEN, C.; VOS, J.H.; QEZADA, M.; GRUYS, E. Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. **European Journal of Veterinary Pathology**, v.3, p. 63-70. 1997.

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

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

STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K.; CHOI, J.; LATIMER, K.S.; KANITZ, L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 57–62. 2001.

STUDDERT, M.J. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.70, p. 121–122. 1993.

TAKAHASHI, K.; IWASA, Y.; HIJIKATA, M.; MISHIRO, S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. **Archives of Virology**, v.145, p. 979-993. 2000.

THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M.C.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Veterinary Pathology**, v.35, p. 108–116. 1998.

TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v.295, p. 64–66. 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GREIM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v.91, p. 271–276. 1986.

TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Archives of Virology**, v.96, p. 39–57. 1987.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene – Erste Abteilung Originale – Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie** 226, p. 153–167. 1974.

TODD, D.; MCNULTY, M.S.; MANKERTZ, A.; LUKERT, P.D.; RANGLES, J.W.; DALE, J.L. (2000). In: VanRegenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Malinoff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Eds.) **Virus Taxonomy**. Seventh report of the ICTV. Academic Press, San Diego.

TODD, D.; WESTON, J.H.; SOIKE, D.; SMYTH, J.A. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, v.286, n.2, p.354-362, 2001.

TRUJANO, M.; IGLESIAS, G.; SEGALES, J.; PALACIOS, J.M. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. **Veterinary Record**, v.148, p. 792. 2001.

WELLENBERG, G.J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F.W.; STEVERINK, P.J.; HUNNEMAN, W.; VAN DER VORST, T.J.; PEPERKAMP, N.H.; OHLINGER, V.F.; SCHIPPERS, R.; VAN OIRSCHOT, J.T.; DE JONG, M.F. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v.22, p. 167–172. 2000.

WELLENBERG, G.J.; STOCKHOFE-ZUWIEDEN, N.; BOERSMA, W.J.A.; DE JONG, M.F.; ELBERS, A.R.W. The Presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case control study. **Research in Veterinary Science**, v.77, p. 177-184. 2004.

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

XIAO, H.; LUO, K.; YANG, S.; WANG, Y.; LIANG, W. Tissue tropism of the TTV in experimentally infected rhesus monkeys. **Chinese Medical Journal**, v. 115, p. 1088–1090. 2002.

ZANELLA, J.R.C. Circovirose suína – Reflexos e ações. In: Simpósio Goiano de suinocultura, Goiânia, GO, **Anais...** 2005, p. 9-15.

ZANELLA, J.R.C. Doenças emergentes na suinocultura: Circovirose suína. In: Congresso da ABRAVES. **Anais**, Porto Alegre. 122-127. 2001.

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

ANEXO

Formulas de soluções e reagentes. Quando necessário, as soluções foram esterilizadas através de autoclavagem por 15 minutos a 121 °C ou filtração com filtros esterilizantes (0,22µm).

Meios de cultura

Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	05 g
NaCl	10 g
Água Milli-Q q.s.p.	1000 ml
Após o preparo o meio é autoclavado	

Agar Luria-Bertani

Meio Luria-Bertani adicionado de 15 g/l de ágar bacteriológico. Após o preparo o meio é autoclavado.

Outras soluções

Ampicilina 50 mg/ml

Ampicilina	500 mg
Água Milli-Q q.s.p.	10 ml
Solução filtrada e armazenada a -20 °C.	

Tris-Cl 1 M

Tris	30,3 g
Água Milli-Q q.s.p.	200 ml
Acertar o pH em 7,4 ou 8,0 com HCl e autoclavar.	

0,5 M EDTA pH 8,0

EDTA	46,5 g
Água Milli-Q q.s.p.	200 ml
Acertar o pH em 8,0 com o NaOH e autoclavar.	

Tampão TE pH 7,4

Tris-Cl pH 7,4	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
Água Milli-Q q.s.p.	100 ml
Solução autoclavada.	

Tampão TEM pH 7,4

Tris-Cl pH 7,4 1 M	10 mM
NaCl 5M	150 mM
EDTA pH 8,0 0,5 M	1 mM
Água Milli-Q q.s.p.	100 ml
Acertar o pH para 7,4 com HCl.	

SDS 10 %

Dodecil sulfato de sódio	10 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 ml

NaCl 5 M

NaCl	73,1 g
Água Milli-Q q.s.p.	250 ml
Solução autoclavada.	

NaOH 10 M

NaOH	40 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 ml

Proteinase K 20 mg/ml

Proteinase K	200 mg
Água Milli-Q q.s.p.	10 ml
Solução armazenada a -20 °C.	

RNAse 10 mg/ml

RNAse	100 mg
Acetato de sódio 0,01 M pH 5,2	10 ml
Aquecer a solução a 100 °C por 15 minutos, deixar esfriar e adicionar 0,1 volume de Tris-Cl 1 M pH 7,4. Solução armazenada a -20 °C.	

Cloreto de cálcio 2 M

Cloreto de cálcio	36,6 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 ml
Solução filtrada	

Soluções para eletroforese em gel de agaroseTampão Tris-acetado EDTA (TAE) 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Água Milli-Q q.s.p.	1000 ml

Tampão de amostra

Azul de bromofenol	0,25 %
Sacarose	40 %
Solução armazenada a 4 °C.	

Brometo de etídio 10 mg/ml

Brometo de etídio	1 g
Água Milli-Q	100 ml

Preparação de DNA plasmidial por Lise alcalinaSolução I

Glicose	50 mM
Tris-Cl pH 8,0 1M	25 mM
EDTA pH 8,0 0,5 M	10 mM
Solução autoclavada e estocada a 4 °C.	

Solução II

SDS 10 %	100 ml
NaOH 10 M	20 ml
Água Milli-Q	880 ml

Preparar a solução na hora de usar.

Solução III

Acetato de potássio 5 M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Água Milli-Q q.s.p.	28,5 ml

Filtrar e estocar a 4 °C.