

PEDRO MARCUS PEREIRA VIDIGAL

ESTUDO FILOGEOGRÁFICO E
ANÁLISE COMPARATIVA DOS MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO
DO PORCINE CIRCOVIRUS-2 (PCV-2).

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

V653e
2010

Vidigal, Pedro Marcus Pereira, 1984-
Estudo filogeográfico e análise comparativa dos modelos
de classificação de porcine circovirus-2 (PCV-2) / Pedro
Marcus Pereira Vidigal. – Viçosa, MG, 2010.
x, 81f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Circovírus suíno. 2. Filogeografia. 3. Filogenia.
4. Epidemiologia. 5. Suíno - Criação. 6. Evolução
(Biologia). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

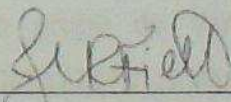
CDD 22. ed. 579.247

PEDRO MARCUS PEREIRA VIDIGAL

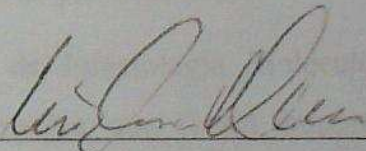
ESTUDO FILOGEOGRÁFICO E
ANÁLISE COMPARATIVA DOS MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO
DO PORCINE CIRCOVIRUS-2 (PCV-2).

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

APROVADA: 30 de julho de 2010.



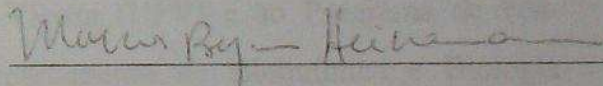
Profª Drª Juliana Lopes Rangel Fietto
(Co-orientadora)



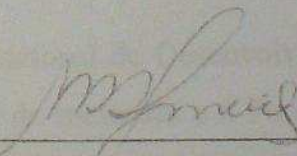
Prof Dr Luiz Orlando de Oliveira
(Co-orientador)



Prof Dr Humberto Josué de Oliveira Ramos



Prof Dr Marcos Bryan Heinemann



Profª Drª Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Santa Rita de Cássia por me permitirem alcançar mais esta conquista e dedico esta dissertação ao meu pai, Fernando Antônio, à minha mãe, Maria do Carmo, e aos meus irmãos, Fernanda e Matheus.

Agradeço especialmente à Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamego (DBB/UFV) por ser, além de orientadora, a principal incentivadora dos trabalhos apresentados nesta dissertação e por acreditar e investir no meu potencial, oferecendo-me sempre total liberdade para desenvolver as minhas idéias.

Também agradeço...

Ao Professor Abelardo Silva Júnior (DVT/UFV) e à Professora Juliana Lopes Rangel Fietto (DBB/UFV), co-orientadores, pelos comentários, críticas e sugestões fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Claudio Mafra (DBB/UFV), co-orientador, pelas longas conversas e discussões que enviesaram as idéias apresentadas neste trabalho e que possibilitaram uma apresentação mais didática dos resultados.

Ao Professor Luiz Orlando de Oliveira (DBB/UFV), co-orientador, pelas sugestões e críticas que aprimoraram as análises filogeográficas.

Ao Núcleo de Bioinformática da UFV (Nubio/UFV) por viabilizar as análises computacionais que demandaram maior capacidade de processamento.

Ao grupo de Virologia do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA/BIOAGRO/UFV) pela riqueza das discussões que foram importantes nos estudos do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) e também por serem, mais do que amigos, companhia e incentivo durante o mestrado.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por esta contribuição na minha formação profissional.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento dos projetos vinculados a esta dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix

INTRODUÇÃO GERAL

Revisão Bibliográfica: <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2).....	1
1.1. INTRODUÇÃO	2
1.2. TAXONOMIA	3
1.3. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO VIRAL	4
1.4. PORCINE CIRCOVIRUS ASSOCIATED DISEASES (PCVAD).....	6
1.5. EPIDEMIOLOGIA	7
1.6. CONTROLE.....	8
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

CAPÍTULO 2

Genótipos versus grupos filogenéticos: Uma análise comparativa dos modelos de classificação do <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2).....	16
2.1 INTRODUÇÃO	17
2.2 METODOLOGIA	19
2.2.1 Alinhamento das sequências de nucleotídeos e organização do conjunto de dados	19
2.2.2 Análises filogenéticas	19
2.2.3 Análise de mismatch distribution.....	20
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
2.5 MATERIAL SUPLEMENTAR	34

CAPÍTULO 3

Tropeçando em patógeno emergente em todo o mundo: uma abordagem filogeográfica do <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2) considerando o mercado mundial.	38
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. METODOLOGIA	41
3.2.1. <i>Organização do conjunto de dados e agrupamento das sequências em haplótipos</i>	42
3.2.2. <i>Informações sobre isolados virais e estatísticas econômicas</i>	43
3.2.3. <i>Análises filogenéticas e filogeográficas</i>	43
3.3. RESULTADOS	45
3.3.1. <i>Análises filogenéticas</i>	45
3.3.2. <i>Análises filogeográficas</i>	46
3.4. DISCUSSÃO	54
3.4.1. <i>Introdução e dispersão do PCV-2 na Europa</i>	56
3.4.2. <i>Introdução e dispersão na Ásia</i>	58
3.4.3. <i>Introdução e dispersão na América do Norte e Caribe</i>	61
3.4.4. <i>Introdução e dispersão na África, América do Sul e Oceania</i>	62
3.4.5. <i>Controlando a dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial</i>	63
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
3.6. MATERIAL SUPLEMENTAR	70

CAPÍTULO 4

Conclusões Gerais	80
-------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1. Organização taxonômica da família *Circoviridae* segundo o ICTV.....3
- Figura 1.2. Representação do genoma do PCV-2.....5

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas.....23
- Figura 2.2. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF2.....24
- Figura 2.3. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF1.....25
- Figura 2.4. *Mismatch distribution* das sequências da ORF2 do PCV-2.....29
- Figura 2.5. *Mismatch distribution* das sequências da ORF1 do PCV-2.....30
- Figura 2.6. *Mismatch distribution* das sequências concatenadas da ORF1 e da ORF2 do PCV-2.....31

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1. Representação esquemática das metodologias utilizadas para analisar as vias de dispersão *Porcine circovirus-2* (PCV-2).....41
- Figura 3.2. Classificação filogenética dos haplótipos do PCV-2.....45
- Figura 3.3. Rede de haplótipos do PCV-2.....49
- Figura 3.4. Previsão das rotas principais de dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial.....53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1. Vacinas contra o <i>Porcine circovirus-2</i> disponíveis comercialmente.....	9
Tabela 1.2. Protótipos vacinais contra o <i>Porcine circovirus-2</i> desenvolvidos pelo LIMA/UFV.....	9

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Nomenclaturas utilizadas pelos grupos de pesquisa que estudam o PCV-2 para diferenciar as linhagens virais.....	17
Tabela 2.2 Parâmetros do programa MrBayes utilizados na análise MCMC.....	20
Tabela S2.1. Sequências completas de genomas do <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2) selecionadas no GenBank.....	34

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Sítios polimórficos presentes nas sequências concatenadas (ORF1-ORF2).....	43
Tabela 3.2 Parâmetros do programa MrBayes utilizados na análise MCMC.....	44
Tabela 3.3. Resumo da classificação filogenética dos isolados do PCV-2.....	47
Tabela 3.4. Haplótipos que agruparam isolados virais do PCV-2 originados de países diferentes.....	50
Tabela S3.1. Sequências completas de genomas do <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2) selecionadas no GenBank.....	70
Tabela S3.2. Resumo das estatísticas econômicas do comércio de suínos (mercadoria 0103) no banco de dados UN Comtrade.....	78

RESUMO

VIDIGAL, Pedro Marcus Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Estudo filogeográfico e análise comparativa dos modelos de classificação do *Porcine circovirus-2* (PCV-2)**. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamego. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Cláudio Lisias Mafra de Siqueira, Juliana Lopes Rangel Fietto e Luiz Orlando de Oliveira.

Os agentes infecciosos de suínos têm recebido grande atenção desde a última década, quando muitos países produtores acumularam perdas econômicas significativas devido a patógenos como o *Porcine circovirus-2* (PCV-2). O PCV-2 é um vírus classificado na família *Circoviridae* e está associado a um conjunto de diferentes síndromes em suínos denominado *Porcine Circovirus Associated Diseases* (PCVAD). Desde a sua identificação e caracterização, o PCV-2 alcançou uma distribuição mundial e a PCVAD tornou-se uma síndrome endêmica na maioria dos países produtores, sendo considerada a principal causa por perdas nas granjas. Neste trabalho, as nomenclaturas propostas para a classificação das linhagens virais foram comparadas e as vias de dispersão do PCV-2 entre os países suinocultores foram analisadas. Uma pesquisa por sequências genômicas do PCV-2 foi realizada no GenBank e 350 sequências de isolados virais foram aleatoriamente selecionadas. Os modelos de classificação do PCV-2 em genótipos, recomendado pelo Consórcio Europeu que estuda as *Porcine circovirus diseases* (PCVD) e definido por análises de *mismatch distribution*, e o modelo de classificação em subgrupos filogenéticos, modelo alternativo e definido por hipóteses filogenéticas, foram aplicados ao conjunto de sequências selecionado. Tanto nas análises de *mismatch distribution* quanto nas análises filogenéticas, os agrupamentos formados e as variações observadas foram muito semelhantes. Nessas análises, observou-se a sobreposição entre os agrupamentos em genótipos e em subgrupos filogenéticos. O genótipo PCV-2a foi correspondente ao Grupo 2 e reuniu os subgrupos 2A, 2B, 2C, 2D e 2E. O genótipo PCV-2b foi correspondente ao Grupo 1 e reuniu os subgrupos 1A, 1B e 1C. O genótipo PCV-2c reuniu apenas a sequência do isolado viral que o define. Esses resultados mostram que as subdivisões existentes nos genótipos PCV-2a e PCV-2b não devem ser desconsideradas para que a diversidade genética existente entre os isolados virais do PCV-2 não seja subestimada. No estudo filogeográfico, as vias de dispersão do PCV-2 foram previstas por meio de abordagens filogenéticas e filogeográficas. Nas análises filogenéticas, as árvores foram calculadas por inferência bayesiana e os isolados virais foram agrupados nos genótipos PCV-2a,

PCV-2b e PCV-2c. Nas análises filogeográficas, uma rede de haplótipos foi calculada pelo algoritmo *Median Joining*, para o estabelecimento da genealogia entre os isolados virais, e as vias de dispersão entre os países foram preditas. Para dar suporte a essas análises, dois bancos de dados foram organizados. O primeiro banco de dados reuniu todas as informações disponíveis sobre os isolados do PCV-2 no GenBank e nas publicações relacionadas ao isolamento viral. O segundo banco de dados reuniu as estatísticas do comércio internacional de suínos vivos disponíveis no *United Nations Commodity Trade Statistics Database DESA/UNSD* e foi organizado para estabelecer um contexto econômico às vias preditas na rede de haplótipos. A partir dessas análises e desses bancos de dados, as seguintes vias de dispersão do PCV-2 entre os países produtores de suínos foram preditas: América do Norte → África, América do Norte → América do Sul, América do Norte → Caribe, Europa → América do Norte, Europa → América do Sul, Europa → Ásia, Oceania → Ásia e Oceania → América do Norte. Nessas vias de dispersão, os principais países de origem das vias são o Canadá, os Estados Unidos, a Dinamarca, a França e a Holanda, que são os principais exportadores de animais no mercado internacional de suínos vivos. As correlações observadas entre as vias de dispersão do PCV-2 preditas nas análises filogeográficas e as estatísticas do comércio internacional de suínos vivos mostram a importância do movimento de animais no rebanho mundial para a emergência de novos patógenos e a necessidade da criação de barreiras sanitárias cada vez mais eficazes no comércio de animais.

ABSTRACT

VIDIGAL, Pedro Marcus Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Phylogeographic study and comparative analysis of classification models of *Porcine circovirus-2* (PCV-2)**. Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamego. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, Cláudio Lisias Mafra de Siqueira, Juliana Lopes Rangel Fietto and Luiz Orlando de Oliveira.

The pig infectious agents have received great attention since the last decade, when many pig producing countries accumulated economic losses due to pathogens such as *Porcine circovirus-2* (PCV-2). The PCV-2 is a virus classified in *Circoviridae* family and is associated with a number of different syndromes in pigs called Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVAD). Since its identification and characterization, PCV-2 has reached a worldwide distribution and the PCVAD became a syndrome endemic in most producer countries and currently considered the main cause for losses on pig farms. In this study, the nomenclatures proposed for the classification of viral isolates were compared, and the spread routes of PCV-2 among pig producing countries were analyzed. A search for genomic sequences of PCV-2 was performed in GenBank and 350 sequences of viral isolates were randomly selected. The classification model of PCV-2 in genotypes, recommended by the European consortium that studies the Porcine circovirus diseases (PCVD) and defined by analysis of mismatch distribution, and the classification model in phylogenetic subgroups, an alternative model defined by phylogenetic hypotheses, were applied to the set of selected sequences. Both in the mismatch distribution analysis and in the phylogenetic analysis, the groups formed and the changes observed were very similar. In these analyses, there was an overlap between genotypes and phylogenetic subgroups. The genotype PCV-2a was equivalent to Group 2 and grouped the subgroups 2A, 2B, 2C, 2D and 2E. The genotype PCV-2b was equivalent to Group 1 and grouped the subgroups 1A, 1B and 1C. The genotype PCV-2c only grouped the sequence of the viral isolate that defines it. These results show that the existing subdivisions in the genotypes of PCV-2a and PCV-2b should not be neglected for don't underestimate the genetic diversity among isolates of PCV-2. In the phylogeographic study, the spread routes of PCV-2 were predicted through phylogenetic and phylogeographic approaches. In phylogenetic analysis, the phylogenetic trees were calculated by Bayesian inference and the isolates were grouped in the genotypes PCV-2a, PCV-2b and PCV-2c. In phylogeographical analysis, a haplotype network was calculated by Median Joining algorithm for the establishment of genealogy among the viral isolates, and the spread routes of PCV-2 among the countries

were predicted. To support these analyses, two databases were organized. The first database grouped all available information on the isolates of PCV-2 in GenBank and in publications related to viral isolation. The second data set grouped the statistics of live pigs' trade available at United Nations Commodity Trade Statistics Database DESA/UNSD and was organized to establish an economic context to establish an economic context in the phylogeographic analysis. From these analyses, the following spread routes of PCV-2 were predicted: North America → Africa, North America → South America, North America → Caribbean, Europe → North America, Europe → South America, Europe → Asia, Oceania → Asia and Oceania → North America. In these spread routes, the main countries of origin of the routes are Canada, United States, Denmark, France and the Netherlands, that are the major exporters of animals in the international trade of live pigs. In this study, were identified correlations between the means of dispersal of PCV-2 in pigs predicted by the phylogeographic context and the statistics on international trade in live pigs. This correlation shows the importance of the movement of animals in the world to the emergence of new pathogens and the need to establish sanitary barriers that are increasingly effective for trade in animals.

INTRODUÇÃO GERAL

Revisão Bibliográfica: *Porcine circovirus-2* (PCV-2).

1.1. INTRODUÇÃO

Na década de 70, um novo vírus que não provocava efeito citopático foi identificado como sendo um agente contaminante em células de rim de suíno da linhagem PK-15 (ATCC-CCL31) (Tischer *et al.*, 1974). Estudos mostraram que as partículas virais possuíam diâmetro de 17 nm, que o genoma viral era constituído por DNA circular fita simples e que apenas os suínos possuíam anticorpos contra esse novo vírus (Tischer *et al.*, 1982). Com base nessas observações, Tischer *et al.* (1982) nomearam esse vírus como *Porcine circovirus* (PCV). O PCV foi considerado não patogênico aos suínos, uma vez que infecções experimentais com o vírus não reproduziram a doença clínica e os animais infectados não apresentaram qualquer alteração patológica visível (Tischer *et al.*, 1986). Os *Porcine circovirus* foram classificados na família *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995).

No final da década de 90, um novo PCV foi identificado em suínos que apresentavam os sintomas da *Postweaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS) (Meehan *et al.*, 1998). A PMWS é uma síndrome que havia sido caracterizada no oeste do Canadá e que provoca elevada mortalidade ou perda de parâmetros produtivos nos suínos acometidos (Harding e Clark, 1997; Harding *et al.*, 1998). As análises genéticas e sorológicas mostraram diferenças significativas entre os PCV contaminantes das células PK-15 e esse novo PCV isolado nos animais com sintomas da PMWS (Meehan *et al.*, 1998). A partir dessas diferenças, esses dois vírus foram nomeados, respectivamente, como *Porcine circovirus-1* (PCV-1) e *Porcine circovirus-2* (PCV-2) (Meehan *et al.*, 1998).

Além da PMWS, o PCV-2 foi associado a um conjunto de diferentes síndromes em suínos denominado *Porcine circovirus associated diseases* (PCVAD) (Opriessnig *et al.*, 2007). As PCVAD rapidamente tornaram-se endêmicas na maioria dos países suinocultores e são consideradas as principais causas das perdas nas granjas (Madec *et al.*, 2008; Ramamoorthy e Meng, 2009; Grau-Roma *et al.*, 2010).

1.2. TAXONOMIA

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (<http://www.ictvonline.org>) classifica o PCV-1 e o PCV-2 como sendo duas espécies virais do gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*. Os vírus classificados na família *Circoviridae* são vírus não envelopados, possuem genomas constituídos por DNA fita simples e são os menores vírus que infectam aves, suínos e outros mamíferos (Ramamoorthy e Meng, 2009).

A família *Circoviridae* é dividida em dois gêneros, o gênero *Gyrovirus* e o *Circovirus* (Figura 1.1). Os *Circovirus* apresentam uma organização genômica diferente dos *Gyrovirus*, possuindo genomas ambisenso (Niagro *et al.*, 1998).

Família:	<i>Circoviridae</i>
Gênero:	<i>Gyrovirus</i>
Espécie:	<i>Chicken anemia virus</i> (CAV)*
Gênero:	<i>Circovirus</i>
Espécies:	<i>Beak and feather disease virus</i> (BFDV) <i>Canary circovirus</i> (CaCV) <i>Duck circovirus</i> (DuCV) <i>Finch circovirus</i> (FiCV) <i>Goose circovirus</i> (GoCV) <i>Gull circovirus</i> (GuCV) <i>Pigeon circovirus</i> (PiCV) <i>Porcine circovirus-1</i> (PCV-1)* <i>Porcine circovirus-2</i> (PCV-2) <i>Starling circovirus</i> (StCV) <i>Swan circovirus</i> (SwCV)

Figura 1.1. Organização taxonômica da família *Circoviridae* segundo o ICTV.

Fonte: ICTV *Virus Taxonomy Release 2009* (<http://www.ictvonline.org/>, acessado em 11 de abril de 2010). As espécies virais marcadas com o asterisco (*) correspondem às espécies tipos dos gêneros.

Os vírus da família *Circoviridae* possuem mecanismos e estruturas de replicação muito semelhantes aos vírus das famílias *Geminiviridae* e *Nanoviridae*, que infectam plantas (Vega-Rocha *et al.*, 2007). Evidências indicam que um ancestral dos *Circovirus* teria sido originado pela recombinação entre os *Nanovirus* (*Nanoviridae*) e os vírus da família *Caliciviridae*, vírus de RNA que infectam vertebrados (Gibbs e Weiller, 1999; Davidson e Silva, 2008). Supõe-se que vertebrados ancestrais, infectados com algum

vírus da família *Caliciviridae*, tenham entrado em contato com a seiva de plantas infectadas com o *Nanovirus* (Gibbs e Weiller, 1999).

O gênero *Circovirus* tem sido constantemente atualizado com a identificação de novas espécies virais e a última espécie viral identificada foi o *Swan Circovirus* (SwCV) (Halami *et al.*, 2008). Com o advento da metagenômica, estudo dos microorganismos totais presentes em um ambiente (Hugenholtz e Tyson, 2008), a família *Circoviridae* também deverá ser atualizada com a identificação de novos genomas virais (Rosario *et al.*, 2009). Recentemente, estudos metagenômicos das fezes de humanos e chimpanzés identificaram novos genomas virais com características genômicas e filogenéticas distintas dos demais vírus da família *Circoviridae* (Blinkova *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Um novo gênero, denominado *Cyclovirus*, foi proposto por Lit *et al.* (2010) e possivelmente será considerado pelo ICTV.

1.3. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO VIRAL

O PCV-1 e o PCV-2 possuem genomas constituídos de DNA circular fita simples e estes genomas compartilham uma identidade que varia entre 68% e 76% (Tischer *et al.*, 1982; Meehan *et al.*, 1998). O genoma do PCV-1 possui 1758 nucleotídeos e o genoma do PCV-2 possui 1767 ou 1768 nucleotídeos.

O genoma do PCV-2, em sua forma duplicada, possui três *Opens Reading Frames* (ORFs) e uma origem de replicação (Figura 1.2). A ORF1 está localizada na fita positiva (senso) do genoma do PCV-2 e ocupa uma região de 945 nucleotídeos que codifica as proteínas Rep (314 aminoácidos) e Rep' (178 aminoácidos), proteínas que estão envolvidas na replicação viral (Bratanich e Blanchetot, 2002; Mankertz *et al.*, 2004). A proteína Rep' é produzida a partir de um processamento alternativo do RNA mensageiro que codifica a proteína Rep (Bratanich e Blanchetot, 2002). Na fita negativa (anti-senso) estão localizadas as duas outras ORFs. A ORF2 ocupa uma região de 702 nucleotídeos e codifica a proteína Cap (233 aminoácidos), proteína estrutural do capsídeo viral (Hamel *et al.*, 1998). A ORF3, por sua vez, ocupa uma região de 315 nucleotídeos e codifica a proteína Apo (104 aminoácidos) que está relacionada com a indução da morte celular por apoptose e com a patogênese viral (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

A origem de replicação está localizada na região intergênica entre as ORF1 e ORF2. Esta região é composta por uma estrutura em forma de grampo e quatro sequências de hexanucleotídeos (H1, H2, H3 e H4) localizadas a jusante (Figura 1.2). A estrutura em grampo, por sua vez, possui uma sequência AxTAXTAC na sua volta e uma sequência palíndromo de 10 nucleotídeos, com 2 citosinas nas posições 3 e 10, localizada na sua haste (Cheung, 2004b).

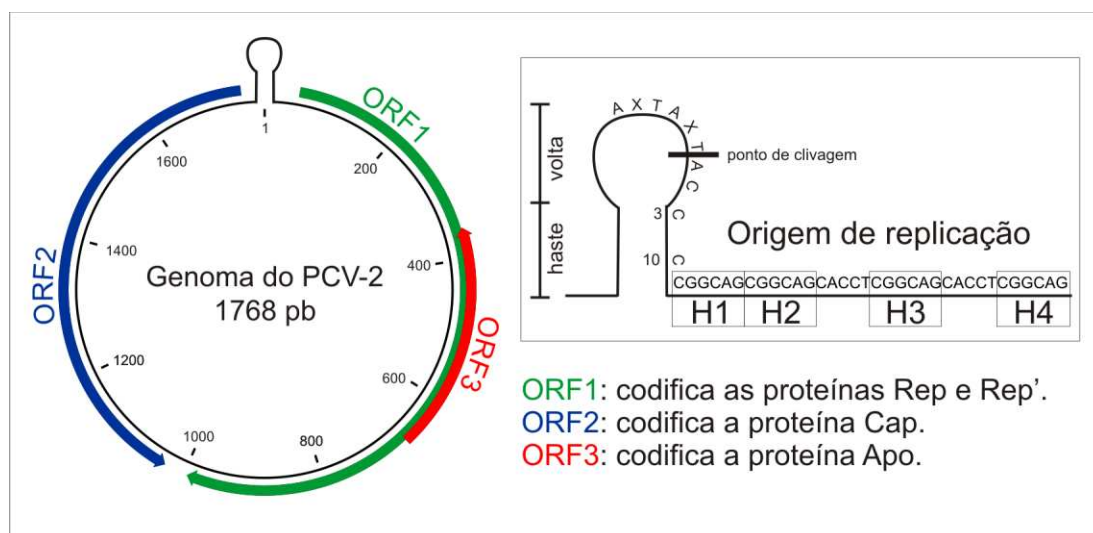


Figura 1.2. Representação do genoma do PCV-2. A ORF1 está localizada na fita positiva (senso) e as ORF2 e ORF3 estão localizadas na fita negativa (anti-senso). O mapa genômico foi obtido utilizando o programa CLC Main Workbench v5.6.1 (CLC bio, USA) e o esquema da origem de replicação foi baseado no trabalho publicado por Faurez *et al.* (2009).

A duplicação do genoma do PCV-2 ocorre na primeira etapa ciclo de replicação viral e o mecanismo desse processo de duplicação ainda é desconhecido (Faurez *et al.*, 2009). Após a duplicação do genoma viral, as proteínas Rep e Rep' se ligam às sequências H1 e H2 na origem de replicação e formam o “complexo protéico iniciador da replicação círculo rolante” (complexo RCR) (Steinfeldt *et al.*, 2001; Faurez *et al.*, 2009). Após a sua formação, esse complexo é posicionado na haste da estrutura em grampo, por meio das 2 citosinas nas posições 3 e 10, e desestabiliza a origem de replicação (Cheung, 2004a). O complexo RCR reconhece a sequência AxTAXTAC e cliva a volta do grampo, gerando uma extremidade 3'OH livre e ligando-se covalentemente à extremidade 5' do genoma viral (Faurez *et al.*, 2009). A DNA polimerase celular inicia a replicação do genoma do PCV-2 a partir da extremidade

3'OH, enquanto o domínio helicase do complexo RCR desenrola a fita positiva (senso). Quando uma unidade do genoma é replicada, o complexo RCR fecha o loop por meio de uma ligação covalente e libera uma cópia da fita positiva (senso) do genoma. Essa cópia, constituída por DNA circular fita simples, pode ser duplicada e iniciar um novo ciclo de replicação ou, então, se associar à proteína do capsídeo (Cap) e formar a partícula viral.

1.4. PORCINE CIRCOVIRUS ASSOCIATED DISEASES (PCVAD)

O conjunto das manifestações clínicas associadas ao PCV-2 é denominado *Porcine circovirus associated diseases* (PCVAD) (Opriessnig *et al.*, 2007; Ramamoorthy e Meng, 2009). Entre as PCVAD, a *Postweaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS) é a principal síndrome em suínos associada ao PCV-2 (Opriessnig *et al.*, 2007; Madec *et al.*, 2008; Ramamoorthy e Meng, 2009; Grau-Roma *et al.*, 2010).

A PMWS afeta os leitões nos estágios de crescimento e de terminação e os principais sintomas incluem a perda de peso, icterícia, complicações respiratórias e a depleção linfóide (Harding e Clark, 1997; Harding *et al.*, 1998; Ramamoorthy e Meng, 2009). Esta síndrome é multifatorial e a sua incidência é maior quando outros agentes co-infecciosos, como o *Porcine parvovirus* (PPV) (Krakowka *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2004a), o *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) (Rovira *et al.*, 2002) e o *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig *et al.*, 2004b), estão presentes. Por esta razão, sabe-se que nem todo suíno que for infectado pelo PCV-2 desenvolverá a PMWS (Kekarainen *et al.*, 2010). Entretanto, a eficácia das vacinas contra o PCV-2 na redução do impacto da PMWS permite confirmar indiretamente que o PCV-2 é o agente infeccioso essencial para o desenvolvimento desta síndrome (Grau-Roma *et al.*, 2010).

Além da PMWS, a *porcine dermatitis and nephropathy syndrome* (PDNS) (Rosell *et al.*, 2000), desordens reprodutivas (West *et al.*, 1999), enterites (Kim *et al.*, 2004), a pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP) (Drolet *et al.*, 2003) e o *porcine respiratory disease complex* (PRDC) (Kim *et al.*, 2003) também estão incluídas no escopo clínico-patológico das PCVAD. Considerando esta diversidade das manifestações, o diagnóstico das PCVAD deve ser realizado pela identificação dos sinais clínicos, pela caracterização das lesões microscópicas nas histopatológicas e pela detecção do genoma viral ou do antígeno viral do PCV-2 nas lesões (Segales e Domingo, 2002; Segales *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.5. EPIDEMIOLOGIA

A transmissão do PCV-2 ocorre predominantemente através do contato com animais infectados por meio das vias oronasal, fecal e urinária (Opriessnig *et al.*, 2007; Madec *et al.*, 2008). Observa-se também a transmissão vertical da porca para os leitões e a transmissão pelo contato com sêmen infectado (Larochelle *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 2006; Madson *et al.*, 2009; Ramamoorthy e Meng, 2009).

Embora a PMWS tenha sido descrita no final da década de 90 (Harding e Clark, 1997), estudos retrospectivos descreveram lesões histopatológicas características da PWMS associadas à identificação do antígeno do PCV-2 em amostras de tecidos de suínos coletadas em 1985 e também demonstraram a infecção de suínos pelo PCV-2 em amostras datadas de 1962 (Jacobsen *et al.*, 2009). Atualmente, a PWMS está disseminada nos cinco continentes, sendo responsável por perdas significativas nos principais países suinocultores, e o PCV-2 é considerado um patógeno onipresente no rebanho suíno mundial (Grau-Roma *et al.*, 2010).

No Brasil, a PMWS foi diagnosticada e associada ao PCV-2 no ano 2000 (Ciacci-Zanella e Morés, 2001; Ciacci-Zanella e Morés, 2003) e estudos retrospectivos, realizados pelo grupo de pesquisa em Infectologia Molecular Animal (LIMA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), identificaram o vírus em amostras de tecidos de suínos datadas de 1978 (dados não publicados). Um estudo filogeográfico realizado por esse mesmo grupo de pesquisa mostrou que a introdução do PCV-2 na suinocultura brasileira poderia estar relacionada a reduzidos eventos de introdução originários principalmente da Ásia e Europa (Chiarelli-Neto *et al.*, 2009b).

Os javalis também são susceptíveis a infecção pelo PCV-2 e a ocorrência de lesões histopatológicas compatíveis com a PMWS tem sido observada (Schulze *et al.*, 2004; Knell *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008). Dessa forma, populações de javalis selvagens podem atuar como reservatórios do PCV-2 e fonte de infecção para os suínos nas regiões produtoras (Sofia *et al.*, 2008). Além disso, a possibilidade da infecção, replicação e transmissão do PCV-2 em camundongos, descrita por Csagola *et al.* (2008), e a recente identificação do PCV-2 em camundongos e ratos capturados em granjas com suínos infectados por Lorincz *et al.* (2010), acendem um sinal de alerta e estabelece um panorama extremamente complexo para a epidemiologia do vírus. Neste panorama, os ratos atuariam na introdução do PCV-2 nas granjas livres do vírus por meio do contato

com reservatórios naturais, na manutenção da infecção pelo PCV-2 dentro granjas de suínos e na dispersão entre as regiões produtoras.

1.6. CONTROLE

O PCV-2 é um vírus estável e resistente ao meio ambiente das granjas de suínos, o que dificulta a erradicação do vírus e facilita a sua disseminação (Ramamoorthy e Meng, 2009). A adoção de um conjunto de práticas de manejo conhecido como o “Plano de 20 pontos de Madec” (Madec *et al.*, 2000) tem sido eficiente para diminuir a mortalidade nas granjas afetadas pelas síndromes associadas ao PCV-2 (Grau-Roma *et al.*, 2010).

As práticas de manejo recomendadas são focadas na manutenção da higiene e na redução do estresse dos animais nos diferentes estágios da criação. Estas práticas incluem procedimentos para o fluxo adequado dos animais (todos dentro/todos fora), desinfecção do ambiente, redução na densidade de animais, monitoramento da temperatura e da qualidade do ar, uso apropriado da vacinação e dos tratamentos antiparasitários e isolamento ou eutanásia dos animais doentes (Madec *et al.*, 2000; Segales e Domingo, 2002; Grau-Roma *et al.*, 2010).

Quatro vacinas contra o PCV-2 estão disponíveis comercialmente e têm sido utilizadas para combater a infecção viral em leitões e porcas (Tabela 1.1). Estas vacinas têm se mostrado eficazes em condições experimentais e a campo, reduzindo a incidência das síndromes associadas ao PCV-2 e a perda dos parâmetros produtivos (Fachinger *et al.*, 2008; Pejsak *et al.*, 2009; Segales *et al.*, 2009).

O grupo de pesquisa em Infectologia Molecular Animal da UFV também tem trabalhado no desenvolvimento e aperfeiçoamento de candidatos vacinais específicos para o controle da infecção pelo PCV-2 no rebanho suíno brasileiro. Três protótipos vacinais (Tabela 1.2) que utilizam a proteína do capsídeo viral do PCV-2 como antígeno foram desenvolvidos e estão sendo testados.

Tabela 1.1. Vacinas contra o *Porcine circovirus-2* disponíveis comercialmente.

Vacina [#]	Companhia	Antígeno
Ingelvac circoflex	Boehringer Ingelheim	Proteína Cap do PCV-2
Suvaxyn PCV2 one dose	Fort Dodge Pfizer	PCV1-2 quimérico inativado
Porcilis PCV*	Intervet-Schering	Proteína Cap do PCV-2
Circumvet PCV*	Plough Animal Health	
Circovac	Merial	PCV-2 inativado

Fonte: Grau-Roma *et al.* (2010). *As vacinas Porcilis PCV e Circumvet PCV correspondem ao mesmo produto, mas são comercializados em países diferentes por empresas diferentes. No Brasil é comercializada a Circumvet PCV. [#]Todas as vacinas listadas estão disponíveis comercialmente no Brasil.

Tabela 1.2. Protótipos vacinais contra o *Porcine circovirus-2* desenvolvidos pelo LIMA/UFV.

Protótipo vacinal	Referência	Antígeno
DNA Recombinante	Silva-Júnior et al. (2009)	Proteína Cap do PCV-2
Proteína recombinante expressa em <i>Escherichia coli</i> *	-	Proteína Cap do PCV-2
Adenovírus recombinante	Chiarelli-Neto et al. (2009a)	Proteína Cap do PCV-2

*O protótipo vacinal encontra-se em processo de patenteamento na Comissão Permanente de Propriedade Intelectual (CPPI) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLINKOVA, O.; VICTORIA, J.; LI, Y.; KEELE, B. F.; SANZ, C.; NDJANGO, J. B.; PEETERS, M.; TRAVIS, D.; LONSDORF, E. V.; WILSON, M. L.; PUSEY, A. E.; HAHN, B. H.; DELWART, E. L. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 1, p. 74-86, 2010.

BRATANICH, A. C.; BLANCHETOT, A. PCV2 replicase transcripts in infected porcine kidney (PK15) cells. **Virus Genes**, v. 25, n. 3, p. 323-328, 2002.

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, 2004a.

CHEUNG, A. K. Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 28-36, 2004b.

CHIARELLI-NETO, O.; SILVA-JÚNIOR, A.; MORAES, M. P.; SIMÃO, G. M. R.; FAUSTO, M. C.; VIDIGAL, P. M. P.; SILVA, F. M. F.; OLIVEIRA, L. L.; FIETTO, J. L. R.; ALMEIDA, M. R. Murine antibody response and protective immunity against porcine circovirus 2 structural protein expressed by recombinant adenovirus. XX Encontro Nacional de Virologia, Brasília, DF. **Virus, Reviews & Research**, p.107-108. 2009a.

CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K. S.; VIDIGAL, P. M.; SILVA, F. M.; CASTRO, L. A.; FIETTO, J. L.; SILVA, A., JR.; ALMEIDA, M. R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Virus Research**, v. 140, n. 1-2, p. 57-63, 2009b.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Diagnostico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovírus Suíno Tipo 2. **Comunicado técnico, EMBRAPA/CNPSA**, v. 270, p. 1-3, 2001.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 522-527, 2003.

CSAGOLA, A.; CADAR, D.; TUBOLY, T. Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 421-427, 2008.

DAVIDSON, I.; SILVA, R. F. Creation of diversity in the animal virus world by inter-species and intra-species recombinations: lessons learned from poultry viruses. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2008.

DROLET, R.; LAROCHELLE, R.; MORIN, M.; DELISLE, B.; MAGAR, R. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 2, p. 143-148, 2003.

FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S. B.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. **Vaccine**, v. 26, n. 11, p. 1488-1499, 2008.

FAUREZ, F.; DORY, D.; GRASLAND, B.; JESTIN, A. Replication of porcine circoviruses. **Virology Journal**, v. 6, p. 60, 2009.

GIBBS, M. J.; WEILLER, G. F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8022-8027, 1999.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALES, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.018, 2010.

HALAMI, M. Y.; NIEPER, H.; MULLER, H.; JOHNE, R. Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. **Virus Research**, v. 132, n. 1-2, p. 208-212, 2008.

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. 5262-5267, 1998.

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

HARDING, J. C. S.; EDWARD G. CLARK; STROKAPPE, J. H.; WILLSON, P. I.; ELLIS, J. A. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. **Journal of Swine Health and Production**, v. 6, n. 6, p. 6, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Microbiology: metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481-483, 2008.

JACOBSEN, B.; KRUEGER, L.; SEELIGER, F.; BRUEGMANN, M.; SEGALES, J.; BAUMGAERTNER, W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 27-33, 2009.

KEKARAINEN, T.; MCCULLOUGH, K.; FORT, M.; FOSSUM, C.; SEGALES, J.; ALLAN, G. M. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 3-4, p. 185-193, 2010.

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

KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, n. 3, p. 251-256, 2003.

KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; CHAE, C. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 3, p. 218-21, 2004.

KNELL, S.; WILLEMS, H.; HERTRAMPF, B.; REINER, G. Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 169-77, 2005.

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, n. 3, p. 254-263, 2000.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4629-4632, 2000.

LI, L.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; BAMIDELE, O. S.; WANG, C.; SHAUKAT, S.; MASROOR, M. A.; WILSON, M. L.; NDJANGO, J. B.; PEETERS, M.; GROSS-CAMP, N. D.; MULLER, M. N.; HAHN, B. H.; WOLFE, N. D.; TRIKI, H.; BARTKUS, J.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1674-1682, 2010.

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, n. 13, p. 8262-8274, 2005.

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 5065-5073, 2006.

LORINCZ, M.; CSAGOLA, A.; BIKSI, I.; SZEREDI, L.; DAN, A.; TUBOLY, T. Detection of porcine circovirus in rodents - Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 58, n. 2, p. 265-268, 2010.

LUKERT, P.; BOER, G. F. D.; DALE, J. L.; KEESE, P.; MCNULTY, M. S.; RANGLES, J. W.; TISCHER, I. The Circoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A. e SUMMERS, M. D. (Ed.). **Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vienna & New York: Springer-Verlag, 1995.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v. 63, n. 3, p. 223-233, 2000.

MADEC, F.; ROSE, N.; GRASLAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, n. 7, p. 273-283, 2008.

MADSON, D. M.; RAMAMOORTHY, S.; KUSTER, C.; PAL, N.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. **Veterinary Research**, v. 40, n. 1, p. 10, 2009.

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, n. 2, p. 81-88, 2004.

MCINTOSH, K. A.; HARDING, J. C.; ELLIS, J. A.; APPELYARD, G. D. Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 1, p. 58-61, 2006.

MEEHAN, B. M.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWURST, 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 (Pt 9), p. 2171-2179, 1998.

NIAGRO, F. D.; FORSTHOEFEL, A. N.; LAWATHER, R. P.; KAMALANATHAN, L.; RITCHIE, B. W.; LATIMER, K. S.; LUKERT, P. D. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Archives of Virology**, v. 143, n. 9, p. 1723-1744, 1998.

OPRIESSNIG, T.; FENAUX, M.; YU, S.; EVANS, R. B.; CAVANAUGH, D.; GALLUP, J. M.; PALLARES, F. J.; THACKER, E. L.; LAGER, K. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3-4, p. 209-20, 2004a.

OPRIESSNIG, T.; THACKER, E. L.; YU, S.; FENAUX, M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 6, p. 624-640, 2004b.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.

PEJSAK, Z.; PODGORSKA, K.; TRUSZCZYNSKI, M.; KARBOWIAK, P.; STADEJEK, T. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, doi:10.1016/j.cimid.2009.09.006, 2009.

RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2009.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. **Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 10, p. 2418-2424, 2009.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; RAMOS-VARA, J. A.; FOLCH, J. M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; DURAN, C. O.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 2, p. 40-43, 2000.

ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALES, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURAN, J.; ROSELL, 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, n. 7, p. 3232-3239, 2002.

SCHULZE, C.; SEGALES, J.; NEUMANN, G.; HLINAK, A.; CALSAMIGLIA, M.; DOMINGO, M. Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Record**, v. 154, n. 22, p. 694-696, 2004.

SEGALES, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **The Veterinary quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109-124, 2002.

SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 3-4, p. 223-229, 2005.

SEGALES, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A.; BRU, T.; CRISCI, E.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S.; BALASCH, M.; SIBILA, M.; XU, Z.; CHU, H. J.; FRAILE, L.; PLANA-DURAN, J. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. **Vaccine**, v. 27, n. 52, p. 7313-7321, 2009.

SILVA-JÚNIOR, A.; CASTRO, L. A.; NETO, O. C.; SILVA, F. M. F.; VIDIGAL, P. M. P.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 76-82, 2009.

SOFIA, M.; BILLINIS, C.; PSYCHAS, V.; BIRTSAS, P.; SOFIANIDIS, G.; LEONTIDES, L.; KNOWLES, N.; SPYROU, V. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 4, p. 864-870, 2008.

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

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl Bakteriolog Orig A.**, v. 226, n. 2, p. 153-167, 1974.

TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, n. 5844, p. 64-66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v. 91, n. 3-4, p. 271-6, 1986.

VEGA-ROCHA, S.; BYEON, I. J.; GRONENBORN, B.; GRONENBORN, A. M.; CAMPOS-OLIVAS, R. Solution structure, divalent metal and DNA binding of the endonuclease domain from the replication initiation protein from porcine circovirus 2. **Journal of Molecular Biology**, v. 367, n. 2, p. 473-487, 2007.

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, n. 6, p. 530-532, 1999.

CAPÍTULO 2

Genótipos versus grupos filogenéticos: Uma análise comparativa dos modelos de classificação do *Porcine circovirus-2* (PCV-2).

2.1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, o *Porcine circovirus-2* (PCV-2) alcançou uma distribuição mundial e os surtos das *Porcine circovirus Associated Diseases* (PCVAD) foram registrados na maioria dos países produtores. A emergência do PCV-2 no rebanho suíno mundial motivou diferentes grupos de pesquisa a realizarem estudos para compreender a evolução, a diversidade genética e a epidemiologia desse vírus.

Nos estudos realizados, pelo menos dois grupos principais têm sido descritos nas análises das hipóteses filogenéticas obtidas a partir das sequências do PCV-2. Entretanto, a falta de padronização na descrição dos agrupamentos filogenéticos gerou confusão dentro da comunidade científica e resultou na adoção de nomenclaturas distintas pelos diferentes grupos de pesquisa que têm o PCV-2 como objeto de estudo (Tabela 2.1) (Segales *et al.*, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2010).

Tabela 2.1. Nomenclaturas utilizadas pelos grupos de pesquisa que estudam o PCV-2 para diferenciar as linhagens virais.

Referência	Nomenclatura utilizada		
Segales <i>et al.</i> (2008)	PCV-2a	PCV-2b	PCV-2c
Grau-Roma <i>et al.</i> (2008)	PCV-2 genótipo 2	PCV-2 genótipo 1	-
Gagnon <i>et al.</i> (2007)	PCV2a	PCV2b	-
Olvera <i>et al.</i> (2007)	Grupo 2	Grupo 1	-
Castro <i>et al.</i> (2007)	Grupo B	Grupo A	-
de Boisseson <i>et al.</i> (2004)	II	I	-

A maioria dos trabalhos listados na Tabela 2.1 esteve focada na descrição da diversidade genética do PCV-2 e na sua relação com a epidemiologia e a evolução da patogenicidade.

O único trabalho proposto com o objetivo principal de sistematizar um modelo de classificação para o PCV-2 foi o realizado por Olvera *et al.* (2007). Esse modelo de classificação divide as linhagens virais do PCV-2 em dois grupos principais (Grupos 1 e 2) e em oito subgrupos (Subgrupos 1A a 1C e 2A a 2E) e foi estabelecido pela análise comparativa das hipóteses filogenéticas obtidas a partir das sequências genômicas do

PCV-2, da ORF1 (região codificadora das proteínas envolvidas na replicação viral) e da ORF2 (região codificadora da proteína do capsídeo viral).

Apesar do trabalho realizado por Grau-Roma et al. (2008) ter como objetivo investigar se os polimorfismos presentes nas sequências da ORF2 possuem alguma relação com a patogenicidade do PCV-2, uma metodologia para a genotipagem dos isolados virais foi proposta pelos autores. Essa metodologia consiste na análise de *mismatch distribution* das sequências da ORF2. Nessas análises, os isolados virais foram agrupados em dois genótipos, PCV-2 genótipo 1 e PCV-2 genótipo 2, e um valor de distância genética (*p-distance*) foi definido para separar os dois grupos.

Com o objetivo de padronizar a nomenclatura que define as linhagens virais do PCV-2, o Consórcio Europeu que estuda as *Porcine circovirus diseases* (PCVD) (<http://www.pcvd.net>) publicou um documento recomendando à comunidade científica a classificação do PCV-2 em três genótipos: PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c (Segales et al., 2008). Essa classificação em três genótipos foi baseada na metodologia de genotipagem proposta por Grau-Roma et al. (2008). Os genótipos PCV-2a e PCV-2b correspondem, respectivamente, aos grupos PCV-2 genótipo 2 e PCV-2 genótipo 1 (Tabela 2.1). O genótipo PCV-2c foi proposto para agrupar três isolados virais, recuperados de amostras coletadas na Dinamarca durante a década de 80 (Segales et al., 2008). Além disso, cada um dos três genótipos é definido por um vírus protótipo, que representa a primeira sequência genômica de cada genótipo do PCV-2 a ser depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O código de acesso AF055392 no GenBank refere-se à sequência do protótipo do genótipo PCV-2a, o código AF055394 refere-se ao genótipo PCV-2b e o código EU148503 refere-se ao genótipo PCV-2c.

A classificação das linhagens virais do PCV-2 em três genótipos pode representar uma visão limitada da diversidade genética deste vírus ao desconsiderar os oito agrupamentos filogenéticos propostos por Olvera et al. (2007). Neste trabalho, os dois modelos de classificação propostos para o PCV-2 são comparados e as diferenças entre os agrupamentos obtidos são analisadas.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Alinhamento das sequências de nucleotídeos e organização do conjunto de dados

Para comparar os dois modelos de classificação propostos para o PCV-2, foram selecionadas 350 sequências genômicas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>. Acessado em 01 de julho de 2010) (Tabela S2.1, Material Suplementar). Nesse conjunto estão incluídas as sequências genômicas utilizadas por Olvera *et. al* (2007) e por Segales *et. al* (2008) para a definição dos agrupamentos filogenéticos e dos genótipos.

Para as análises filogenéticas e de *mismatch distribution*, o conjunto de dados de sequências genômicas foi subdivido em três outros grupos de sequências: sequências da ORF1, sequências da ORF2 e sequências das ORF1-ORF2 concatenadas. Essa abordagem foi utilizada para comparar o efeito dessas ORFs na determinação dos agrupamentos dos isolados virais do PCV-2. Os três conjuntos de sequências foram alinhados no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), utilizando as configurações padrão para a abertura e a extensão de *gaps*.

2.2.2 Análises filogenéticas

Os agrupamentos filogenéticos foram estabelecidos a partir de hipóteses filogenéticas inferidas por inferência bayesiana, utilizando o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001).

Para agilizar a construção das árvores filogenéticas, um modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado utilizando o programa MrModeltest (Nylander *et al.*, 2004). Essa abordagem forneceu ao programa MrBayes os parâmetros a serem estimados, evitando o excesso de parâmetros dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanhos de ramos.

As árvores filogenéticas foram calculadas no MrBayes pelo método de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e utilizando os parâmetros listados na Tabela 2.2. Uma vez obtida as hipóteses filogenéticas, os agrupamentos foram formados de acordo com os dois modelos de classificação do PCV-2 propostos por Olvera *et al.* (2007) e por Segales *et al.* (2008). As sequências classificadas nesses dois trabalhos serviram como

referência para determinação dos agrupamentos. As árvores filogenéticas consenso foram editadas utilizando o programa FigTree Version1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) e as suas topologias foram comparadas (Figuras 2.1, 2.2 e 2.3).

Tabela 2.2 Parâmetros do programa MrBayes utilizados na análise MCMC.

Parâmetro	Valor
Frequência de amostragem das árvores (<i>samplefreq</i>)	1000
Números de corridas independentes (<i>nruns</i>)	2
Números de cadeias (<i>nchains</i>)	4
Números de gerações (<i>ngen</i>)	20000000
Número de amostras descartadas (<i>burnin</i>)*	12500

*No MrBayes, a topologia e os valores de probabilidade posterior da árvore filogenética consenso são calculados considerando-se as árvores filogenéticas amostradas na fase estacionária da distribuição de probabilidade *a posteriori* e descartando as árvores filogenéticas amostradas na fase não estacionária. O parâmetro *burnin* representa as árvores filogenéticas que são descartadas e o seu valor padrão corresponde à parcela de 25% do total de árvores amostradas.

2.2.3 Análise de mismatch distribution

A análise de *mismatch distribution* consiste em contar o número de diferenças entre dois pares de sequências em uma amostra e utilizar os resultados para construir um histograma (Schneider e Excoffier, 1999). Nesse gráfico, a formação de múltiplos picos indica a presença de subdivisões no conjunto de dados analisados.

Para testar a metodologia de genotipagem do PCV-2 proposta por Grau-Roma *et al.* (2008) e a classificação em genótipos proposta por Segales *et al.* (2008), os três grupos de sequências (ORF1, ORF2 e ORF1-ORF2) selecionados neste trabalho foram analisados. As análises de *mismatch distribution* foram calculadas no programa Arlequin version 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005), utilizando as configurações padrão. As duas sequências do PCV-1 (AY660574 e AY193712) também foram selecionadas como grupo externo nessas análises.

Para representar os agrupamentos formados nos histogramas, um cladograma foi obtido no programa MEGA version 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) para cada grupo de

sequências analisado. O cladograma foi calculado utilizando a metodologia de *Neighbor-Joining* e considerando o modelo de *number of differences*, que é o mesmo modelo utilizado na análise de *mismatch distribution*.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho retomam a discussão dos modelos de classificação do *Porcine circovirus-2* (PCV-2), comparando a classificação das linhagens virais em genótipos com a classificação em subgrupos filogenéticos.

A hipótese filogenética obtida a partir das sequências concatenadas da ORF1 e ORF2 do PCV-2 (Figura 2.1) foi capaz de reunir os isolados virais conforme os agrupamentos propostos por Olvera *et al.* (2007) e Segales *et al.* (2008). A análise da topologia da árvore filogenética mostra a sobreposição entre os agrupamentos em subgrupos filogenéticos e em genótipos. O genótipo PCV-2a foi correspondente ao Grupo 2 e reuniu os subgrupos 2A, 2B, 2C, 2D e 2E. O genótipo PCV-2b foi correspondente ao Grupo 1 e reuniu os subgrupos 1A, 1B e 1C. O genótipo PCV-2c reuniu apenas a sequência do isolado viral que o define. De acordo com Segales *et al.* (2008), esse genótipo está restrito apenas a três isolados virais identificados na Dinamarca durante a década de 80. Sendo assim, um terceiro grupo deveria ser criado na classificação proposta por Olvera *et al.* (2007) para acomodar esses isolados virais.

Essa sobreposição dos três genótipos agrupando os oito subgrupos filogenéticos, na árvore filogenética (Figura 2.1), mostra que os genótipos apresentam subdivisões e que essas estariam sendo desconsideradas na classificação proposta por Segales *et al.* (2008).

A semelhança entre as hipóteses filogenéticas obtidas a partir das sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas (Figura 2.1) e da ORF2 (Figura 2.2) mostram que as sequências da ORF2 são um bom sinal filogenético para a classificação dos isolados virais do PCV-2. Essas mesmas observações levaram Olvera *et al.* (2007) e Segales *et al.* (2008) a recomendarem a utilização das sequências da ORF2 para classificação dos isolados virais do PCV-2. Entretanto, não é possível distinguir os subgrupos 1A e 1B na árvore filogenética obtida a partir das sequências da ORF2 (Figura 2.2). Os isolados virais desses subgrupos possuem sequências da ORF2 muito semelhantes e estão reunidos no mesmo clado na árvore filogenética. Considerando a impossibilidade de

distinguir esses subgrupos, Chiarelli-Neto *et. al* (2009) propuseram o grupo 1AB para definir esse agrupamento nas análises com a ORF2.

A diferenciação entre os subgrupos 1A e 1B somente se torna evidente se as sequências da ORF1 também forem consideradas nas análises filogenéticas. Dessa maneira, a utilização das sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas (Figura 2.1) se torna a estratégia mais interessante para a correta classificação dos isolados virais do PCV-2 dentro do modelo proposto por Olvera *et al.* (2007). Mesmo assim, algumas sequências do Grupo 1 e do Grupo 2 não foram incluídas nos subgrupos propostos na árvore filogenética (Figura 2.1). Essa limitação dos agrupamentos também foi observada por Olvera *et al.* (2007).

Na análise filogenética das sequências da ORF1 (Figura 2.3), não foi possível agrupar os isolados virais do PCV-2 nos subgrupos propostos por Olvera *et al.* (2007). Além disso, isolados virais classificados no Grupo 1 (genótipo PCV-2b) foram incluídos no Grupo 2 (genótipo PCV-2a) e vice-versa. Também se observa que os isolados virais classificados nos subgrupos 1C e 2B e no genótipo PCV-2c foram incluídos no mesmo clado. Essas observações comprovam que a ORF1 não é o sinal filogenético mais adequado para a correta classificação dos isolados virais do PCV-2, mas, ao mesmo tempo, também mostram que as análises dessas sequências podem revelar informações importantes sobre eventos de recombinação.

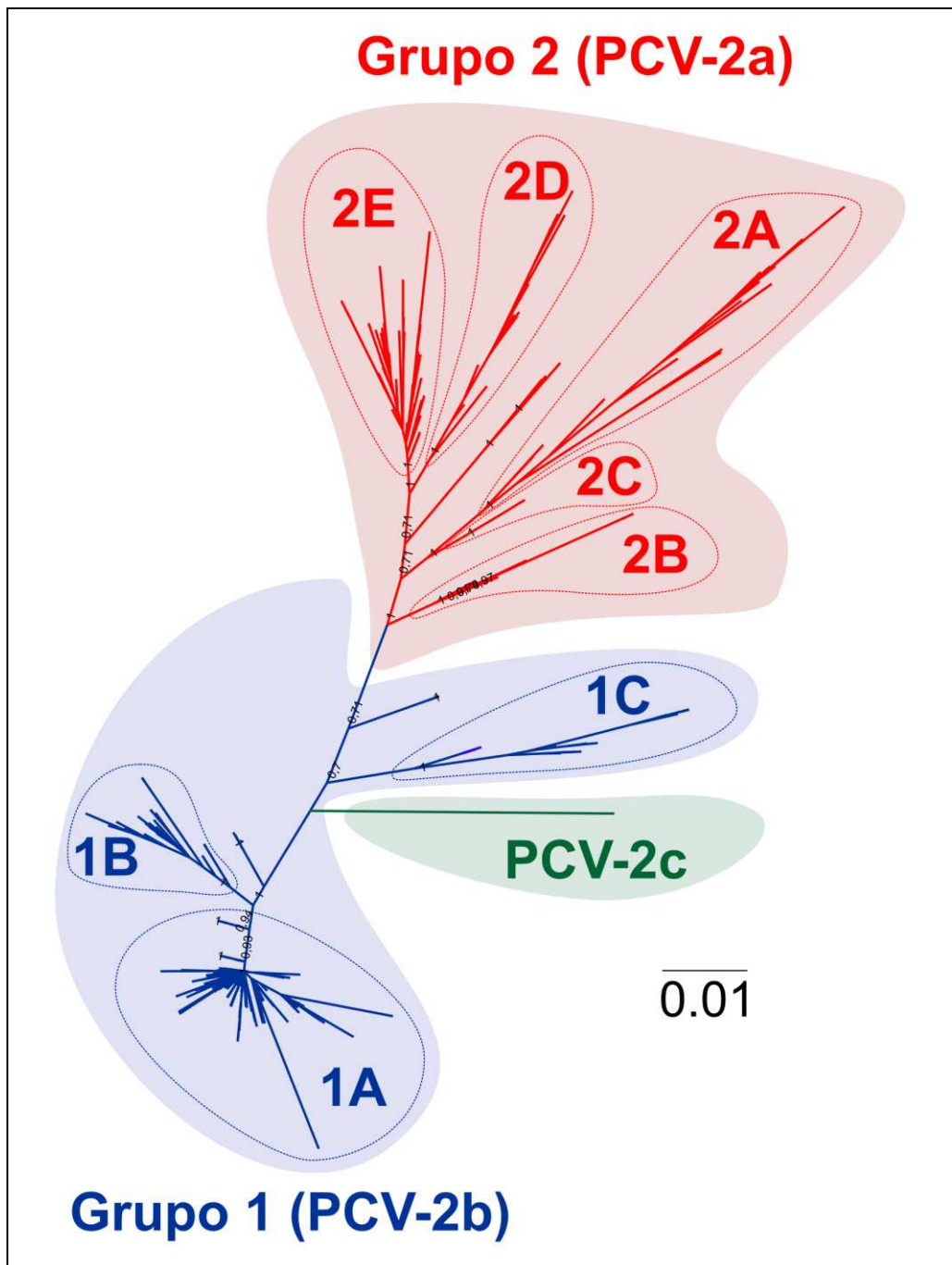


Figura 2.1. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas. Árvore filogenética não enraizada consenso obtida por inferência bayesiana. Os números juntos aos nós dos ramos da árvore filogenética indicam os valores de probabilidade posterior que definem os agrupamentos. Os oito agrupamento internos (1A a 1C e 2A a 2E) e os três agrupamentos externos (PCV-2a, PCV-2b, PCV-2c) correspondem, respectivamente, às classificações em subgrupos filogenéticos proposta por Olvera *et al.* (2007) e em genótipos proposta por Segales *et al.* (2008).

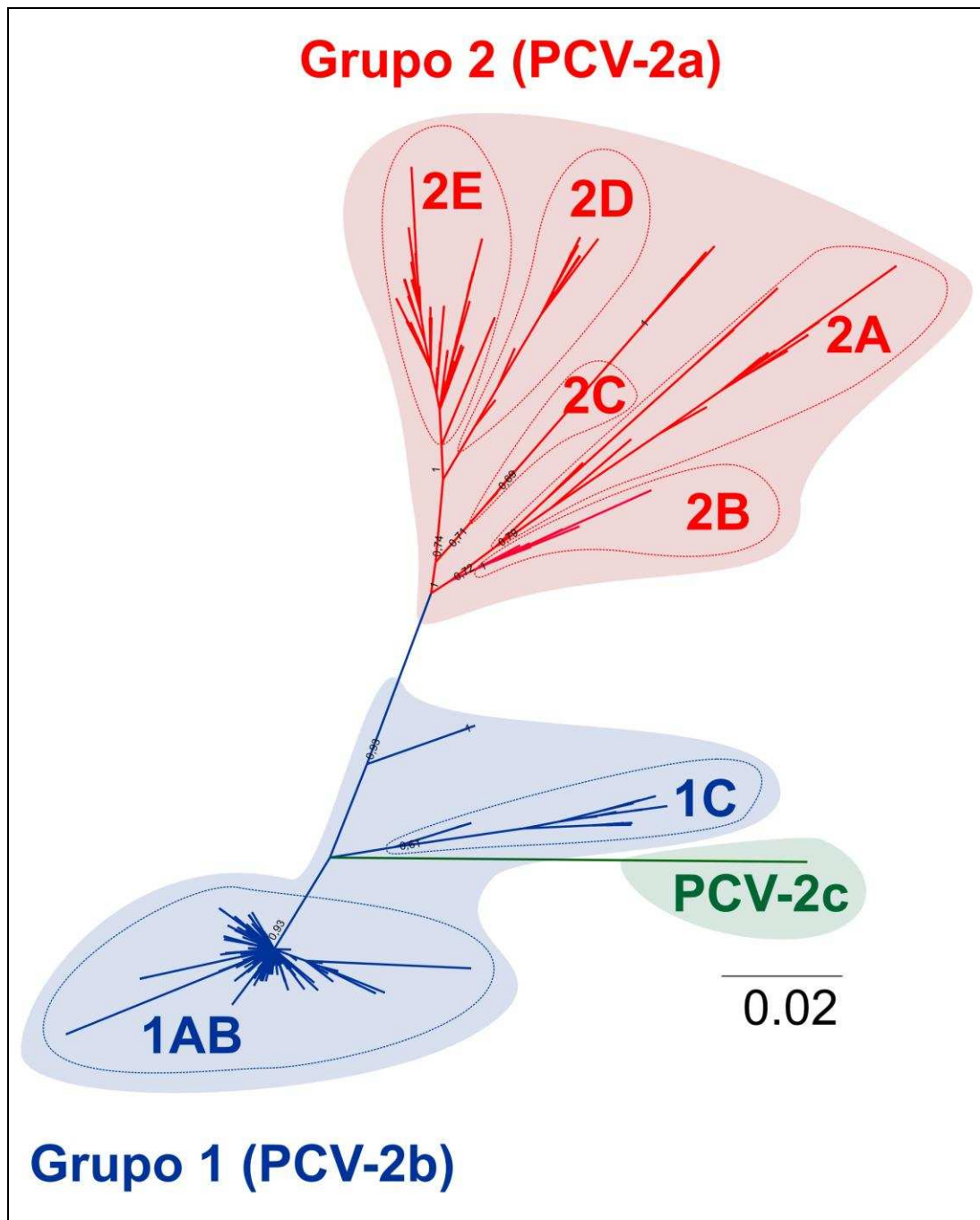


Figura 2.2. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF2. Árvore filogenética não enraizada consenso obtida por inferência bayesiana. Os números juntos aos nós dos ramos da árvore filogenética indicam os valores de probabilidade posterior que definem os agrupamentos. Os oito agrupamento internos (1A a 1C e 2A a 2E) e os três agrupamentos externos (PCV-2a, PCV-2b, PCV-2c) correspondem, respectivamente, às classificações em subgrupos filogenéticos proposta por Olvera *et al.* (2007) e em genótipos proposta por Segales *et al.* (2008).

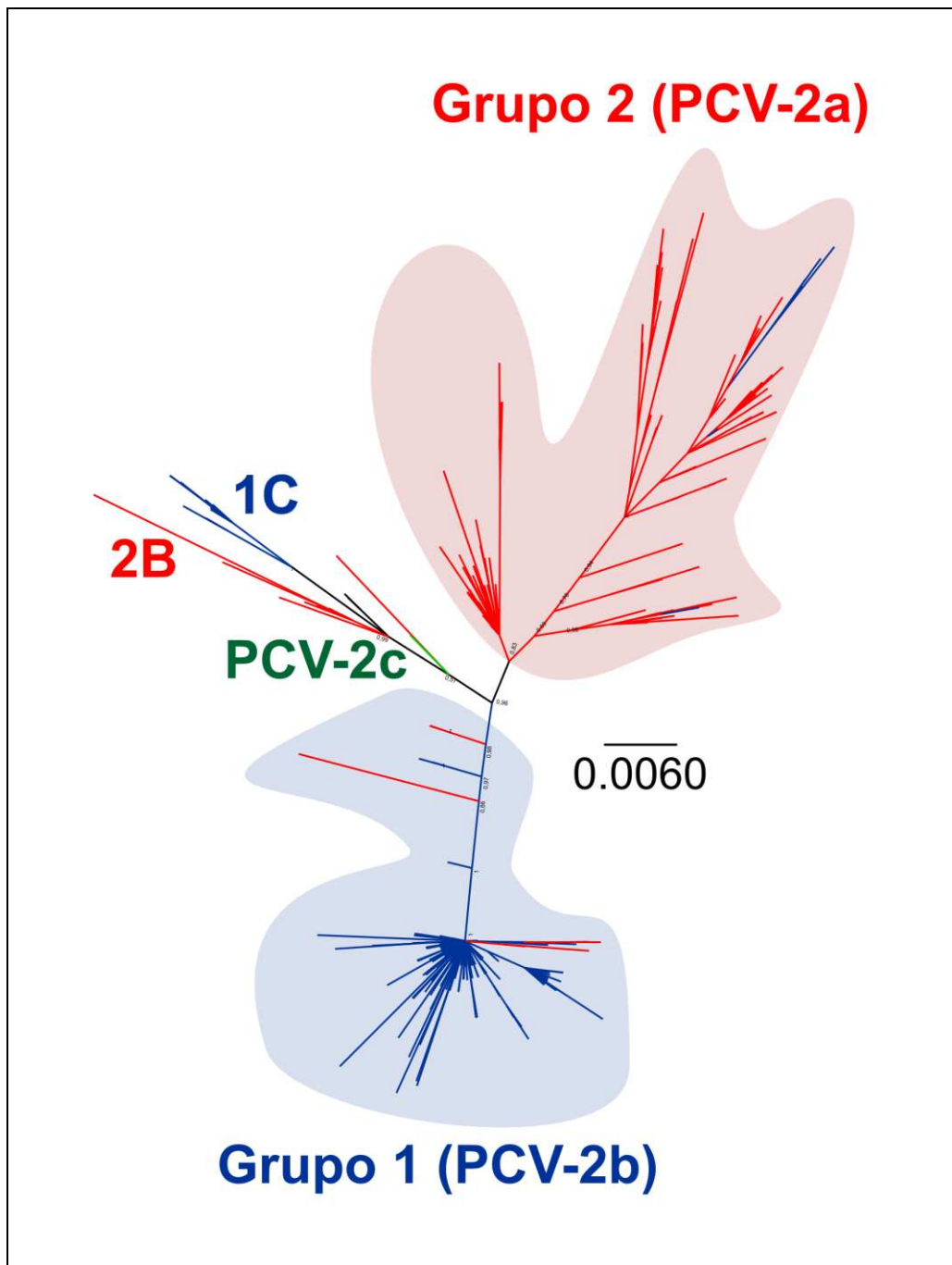


Figura 2.3. Classificação das linhagens virais do PCV-2 em subgrupos filogenéticos e em genótipos utilizando as sequências da ORF1. Árvore filogenética não enraizada consenso obtida por inferência bayesiana. Os números juntos aos nós dos ramos da árvore filogenética indicam os valores de probabilidade posterior que definem os agrupamentos. Os agrupamentos correspondem às classificações em subgrupos e em genótipos propostas, respectivamente, por Olvera *et al.* (2007) e Segales *et al.* (2008). As variações nos agrupamentos podem ser observadas por meio do posicionamento dos ramos azuis (Grupo1 ou PCV-2b) e vermelhos (Grupo 2 ou PCV-2a).

A metodologia proposta por Grau-Roma *et al.* (2008) foi eficaz para agrupar as sequências da ORF2 e classificar os isolados virais do PCV-2 nos três genótipos (PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c) estabelecidos por Segales *et al.* (2008) (Figura 2.4).

Para distinguir os genótipos do PCV-2, Grau-Roma *et al.* (2008) e Segales *et al.* (2008) definiram que os três genótipos estariam separados por um valor de distância genética (*p-distance*) maior do que 0,035. Esse valor é calculado dividindo-se o número de diferenças existentes entre duas sequências (*pairwise differences*) pelo número total de nucleotídeos presentes nas sequências (Tamura *et al.*, 2007). Considerando esse valor, dois isolados virais do PCV-2 somente serão incluídos no mesmo genótipo se as sequências de nucleotídeos da ORF2 apresentarem uma identidade maior do que 96,5%.

Na análise de *mismatch distribution* das sequências da ORF2, dois picos principais são observados no gráfico (Figura 2.4). Esses picos correspondem aos genótipos PCV-2a e PCV-2b, que são os grupos com o maior número de isolados virais, e estão separados pelo valor de distância genética igual a 0,035 (*pairwise differences* igual a 24). O pico que representa o genótipo PCV-2c não pode ser distinguido no gráfico, uma vez que apenas uma sequência está incluída nesse genótipo. Por outro lado, esse valor de distância genética foi capaz de separar os genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c no cladograma (Figura 2.4).

As análises de *mismatch distribution* das sequências da ORF1 (Figura 2.5) e da ORF1 e ORF2 concatenadas apresentaram variações importantes quando comparadas com as análises da ORF2 e essas indicam algumas limitações tanto da metodologia como do agrupamento em genótipos.

O padrão de picos observado no gráfico de *mismatch distribution* das sequências da ORF1 (Figura 2.5) é muito semelhante ao observado na análise das sequências da ORF2 (Figura 2.4). Entretanto, não foi possível estabelecer um valor de distância genética para a separação dos três genótipos e os representantes dos genótipos PCV-2a e PCV-2c foram reunidos no mesmo agrupamento no cladograma (Figura 2.5). Além disso, as mesmas variações encontradas na árvore filogenética obtida a partir das sequências da ORF1 também foram encontradas no cladograma. Isolados virais classificados no genótipo PCV-2a (ou Grupo 2) foram incluídos no genótipo PCV-2b (ou Grupo 1) e vice-versa. Dessa maneira, não é possível a utilização das sequências da

ORF1 para a classificação do PCV-2 dentro do modelo proposto por Segales *et al.* (2008).

A análise de *mismatch distribution* das sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas, por sua vez, revela a subdivisão dos genótipos (Figura 2.6). Essa subdivisão está evidenciada pela observação de um terceiro pico no gráfico de *mismatch distribution* no ponto correspondente ao valor de número de diferenças (*pairwise differences*) igual a 25, que equivale a um valor de distância genética igual a 0,015. A utilização desse valor para a definição dos agrupamentos no cladograma mostra que os genótipos PCV-2a e PCV-2b apresentam subdivisões, conforme o observado nas análises filogenéticas.

Considerando que essa subdivisão somente é detectada nas análises com as sequências da ORF1-ORF2 concatenadas, ela poderia ser explicada pelas variações também observadas na comparação dos agrupamentos filogenéticos. O subgrupo 1B, proposto por Olvera *et al.* (2007), somente pôde ser distinguido do subgrupo 1A na árvore filogenética obtida a partir das sequências ORF1 e ORF2 concatenadas (Figura 2.1). A utilização dessas sequências na análise de *mismatch distribution* pode ter causado o mesmo efeito no gráfico, sendo observado um novo pico.

Essa comparação dos modelos de classificação das linhagens virais do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) mostra que os agrupamentos propostos pelos autores independem da metodologia empregada. Tanto nas análises filogenéticas (Figuras 2.1, 2.2 e 2.3) quanto nas análises de *mismatch distribution* (Figuras 2.4, 2.5 e 2.6) os agrupamentos formados e as variações observadas foram muito semelhantes. Portanto, o agrupamento dos isolados virais em três genótipos representa uma visão limitada da diversidade genética existente entre as cepas do PCV-2 ao desconsiderar as subdivisões existentes nos genótipos PCV-2a e PCV-2b.

De acordo com Segales *et al.* (2008), a proposta de classificação do PCV-2 em três genótipos representa uma tentativa de unificar a nomenclatura das linhagens virais, encerrando a confusão gerada na comunidade científica e reconciliando com a nomenclatura proposta por Gagnon *et al.* (2007) (Tabela 2.1). Os representantes dos principais grupos de pesquisa europeus e norte-americanos que estudam o PCV-2 assinaram o documento que define a classificação nos genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c, o que também sugere um caráter político para estas decisões.

A padronização da nomenclatura que define as linhagens virais do PCV-2 representa um grande avanço ao facilitar o intercâmbio de idéias entre os grupos de pesquisa que estudam o vírus. Por outro lado, as subdivisões existentes nos genótipos PCV-2a e PCV-2b não devem ser desconsideradas para que a diversidade genética existente entre os isolados virais do PCV-2 não seja subestimada.

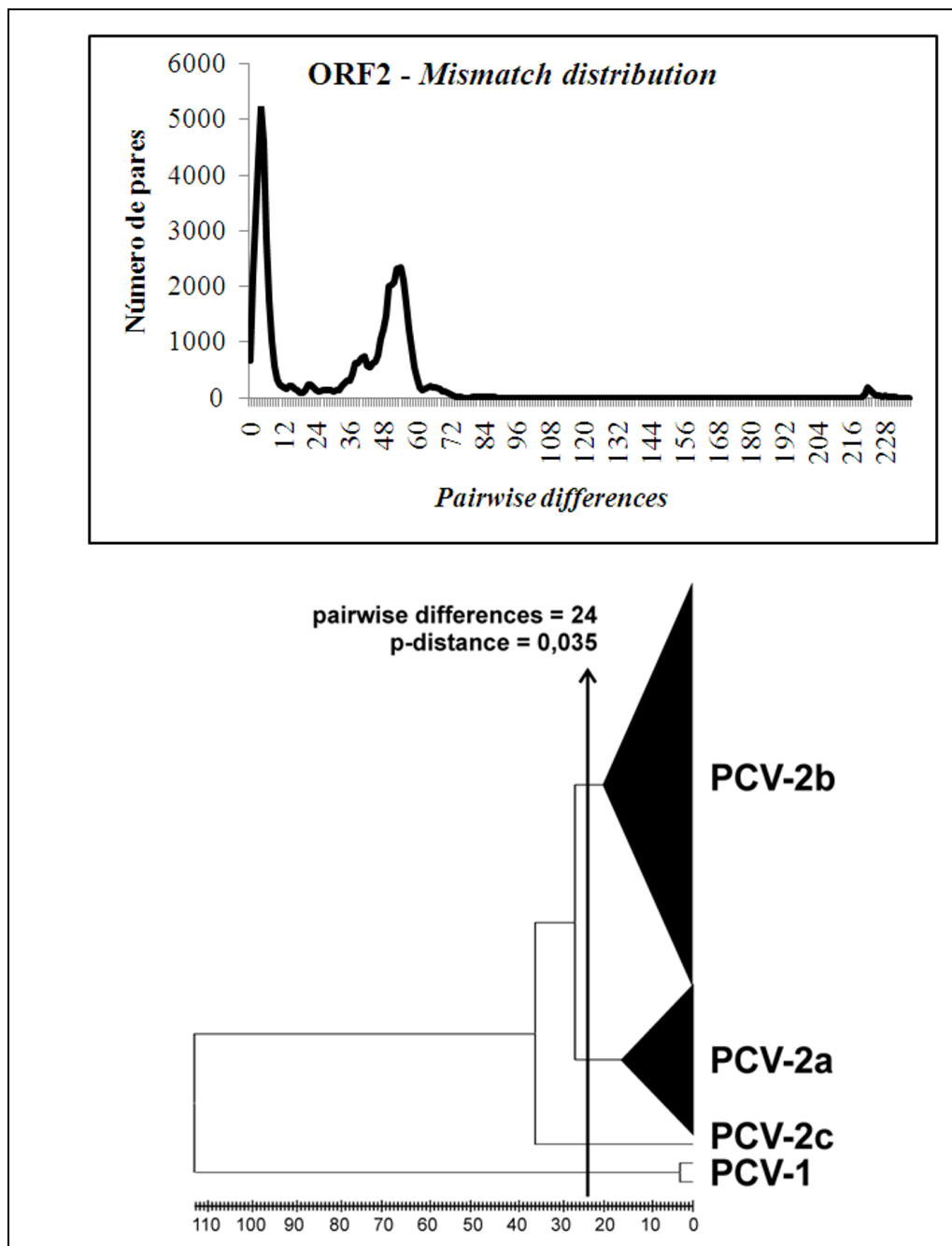


Figura 2.4. *Mismatch distribution* das seqüências da ORF2 do PCV-2. O gráfico representa os resultados da análise de *mismatch distribution* obtidos no programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Duas seqüências do PCV-1 (AY660574 e AY193712) foram utilizadas como grupo externo nas análises. O cladograma foi calculado utilizando a metodologia de *Neighbor-Joining* no programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007) e o valor de distância genética (*p-distance*) utilizado para definir os agrupamentos foi estabelecido por Grau-Roma *et al.* (2008) e Segales *et al.* (2008) para a classificação dos isolados virais do PCV-2 nos genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c.

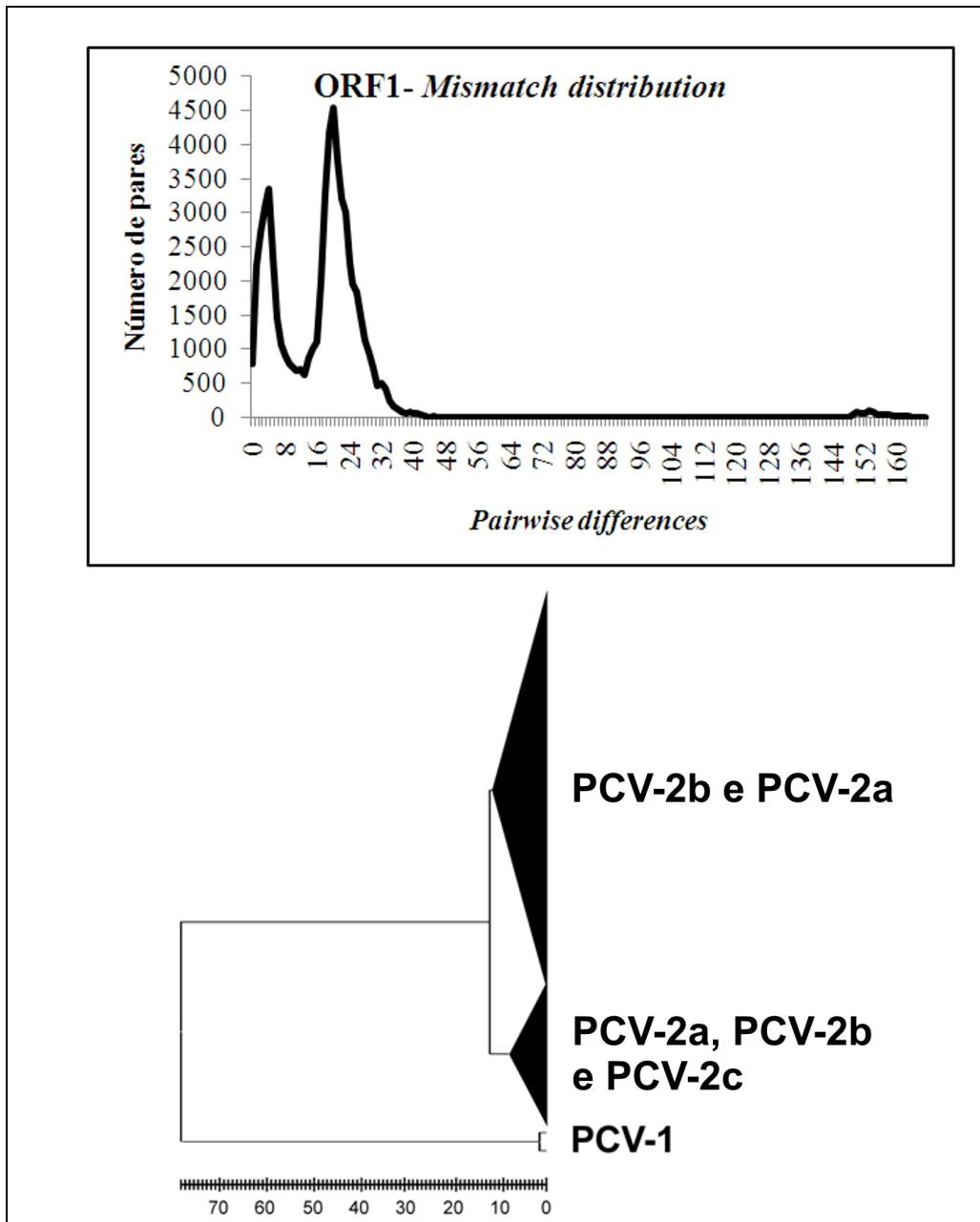


Figura 2.5. *Mismatch distribution* das seqüências da ORF1 do PCV-2. O gráfico representa os resultados da análise de *mismatch distribution* obtidos no programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Duas seqüências do PCV-1 (AY660574 e AY193712) foram utilizadas como grupo externo nas análises. O cladograma foi calculado utilizando a metodologia de *Neighbor-Joining* no programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007).

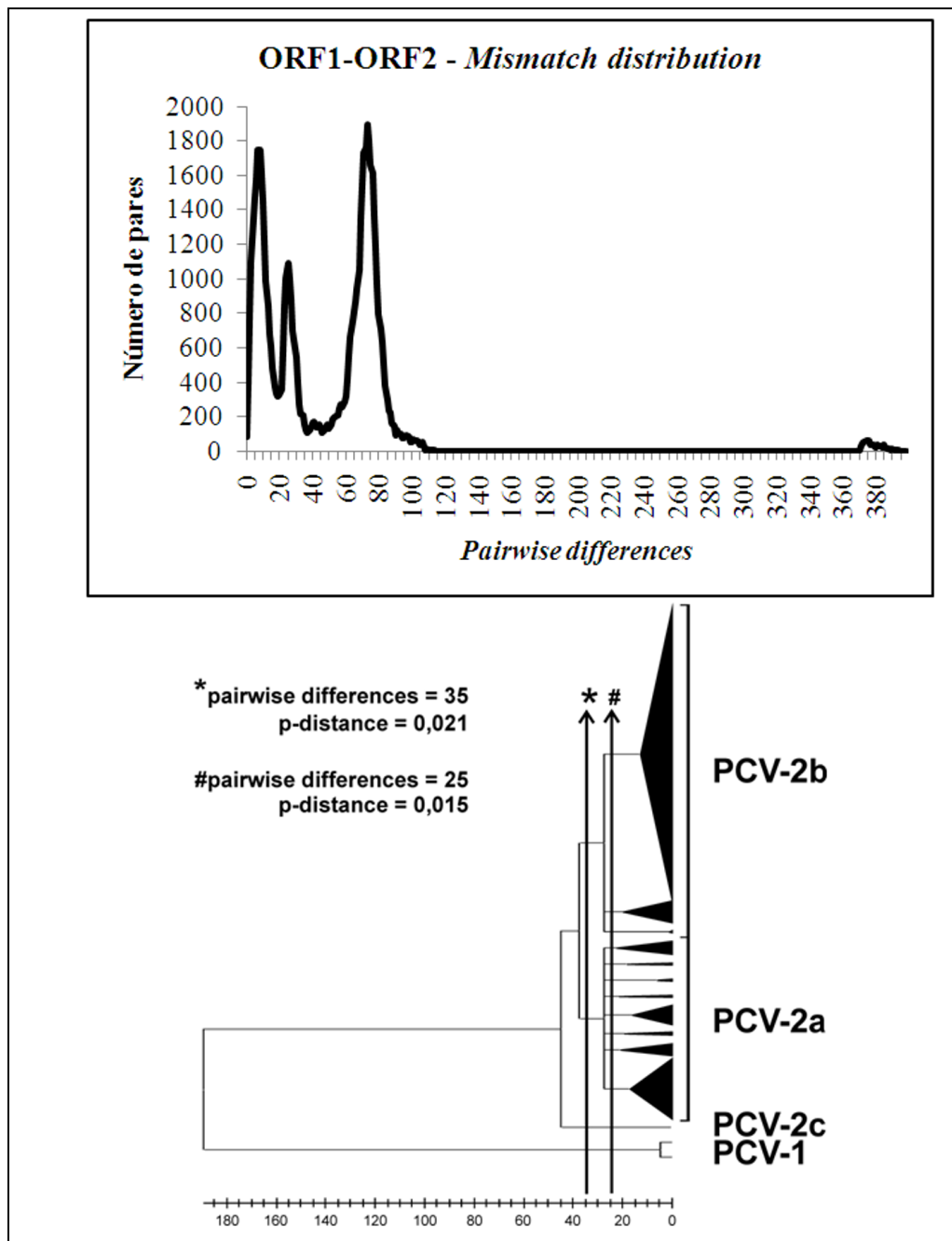


Figura 2.6. *Mismatch distribution* das seqüências concatenadas da ORF1 e da ORF2 do PCV-2. O gráfico representa os resultados da análise de *mismatch distribution* obtidos no programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Duas seqüências do PCV-1 (AY660574 e AY193712) foram utilizadas como grupo externo nas análises. O cladograma foi calculado utilizando a metodologia de *Neighbor-Joining* no programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007). *Valor de distância genética (*p-distance*) capaz de separar os isolados virais nos três genótipos (PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c) propostos por Segales *et al.* (2008). #Valor de distância genética (*p-distance*) que corresponde ao terceiro pico observado no gráfico e que evidencia a subdivisão dos genótipos.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K. S.; VIDIGAL, P. M.; SILVA, F. M.; CASTRO, L. A.; FIETTO, J. L.; SILVA, A., JR.; ALMEIDA, M. R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Virus Research**, v. 140, n. 1-2, p. 57-63, 2009.

DE BOISSESON, C.; BEVEN, V.; BIGARRE, L.; THIERY, R.; ROSE, N.; EVENO, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 2, p. 293-304, 2004.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

GAGNON, C. A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P.; VENNE, M. H.; HOUDE, A.; ELAHI, S. M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p. 811-9, 2007.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALES, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 23-35, 2008.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALES, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, 2010.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-5, 2001.

MARTINS GOMES DE CASTRO, A. M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). **Archives of Virology**, v. 152, n. 8, p. 1435-45, 2007.

NYLANDER, J. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology**, v. 357, n. 2, p. 175-85, 2007.

SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 152, n. 3, p. 1079-89, 1999.

SEGALES, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**, v. 162, n. 26, p. 867-8, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

2.5 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S2.1. Sequências completas de genomas do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) selecionadas no GenBank. Os códigos de acesso marcados com asterisco (*) correspondem aos isolados virais classificados por Olvera *et al.* (2007).

Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos	Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos
EU148503	--	PCV-2c	AY322001*	1A	PCV-2b
AY682992	1-	PCV-2b	AY322002*	1A	PCV-2b
EF565354	1-	PCV-2b	AY391729*	1A	PCV-2b
EU302139	1-	PCV-2b	AY424404*	1A	PCV-2b
EU302140	1-	PCV-2b	AY424405*	1A	PCV-2b
EU418627	1-	PCV-2b	AY484408*	1A	PCV-2b
EU450592	1-	PCV-2b	AY484409*	1A	PCV-2b
FJ644920	1-	PCV-2b	AY484411*	1A	PCV-2b
FJ644921	1-	PCV-2b	AY484412*	1A	PCV-2b
FJ905468	1-	PCV-2b	AY484413*	1A	PCV-2b
AF055394	1A	PCV-2b	AY484414*	1A	PCV-2b
AF201897*	1A	PCV-2b	AY484415*	1A	PCV-2b
AF538325*	1A	PCV-2b	AY484416*	1A	PCV-2b
AY181945*	1A	PCV-2b	AY536755*	1A	PCV-2b
AY188355*	1A	PCV-2b	AY536756*	1A	PCV-2b
AY217743*	1A	PCV-2b	AY578327*	1A	PCV-2b
AY288134*	1A	PCV-2b	AY579893*	1A	PCV-2b
AY291316*	1A	PCV-2b	AY604430*	1A	PCV-2b
AY321984*	1A	PCV-2b	AY613854*	1A	PCV-2b
AY321985*	1A	PCV-2b	AY641542*	1A	PCV-2b
AY321986*	1A	PCV-2b	AY651850*	1A	PCV-2b
AY321987*	1A	PCV-2b	AY682990*	1A	PCV-2b
AY321988*	1A	PCV-2b	AY686762*	1A	PCV-2b
AY321989*	1A	PCV-2b	AY686764*	1A	PCV-2b
AY321990*	1A	PCV-2b	AY732494*	1A	PCV-2b
AY321991*	1A	PCV-2b	AY849938*	1A	PCV-2b
AY321992*	1A	PCV-2b	AY874163	1A	PCV-2b
AY321994*	1A	PCV-2b	AY969004*	1A	PCV-2b
AY321995*	1A	PCV-2b	DQ017036*	1A	PCV-2b
AY321996*	1A	PCV-2b	DQ104420*	1A	PCV-2b
AY321997*	1A	PCV-2b	DQ104422*	1A	PCV-2b
AY321998*	1A	PCV-2b	DQ180392	1A	PCV-2b
AY321999*	1A	PCV-2b	DQ220727	1A	PCV-2b
AY322000*	1A	PCV-2b	DQ220728	1A	PCV-2b

Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos	Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos
DQ220729	1A	PCV-2b	EF565350	1A	PCV-2b
DQ220730	1A	PCV-2b	EF565351	1A	PCV-2b
DQ220731	1A	PCV-2b	EF565352	1A	PCV-2b
DQ220732	1A	PCV-2b	EF565353	1A	PCV-2b
DQ220733	1A	PCV-2b	EF565355	1A	PCV-2b
DQ220734	1A	PCV-2b	EF565356	1A	PCV-2b
DQ220735	1A	PCV-2b	EF565357	1A	PCV-2b
DQ220736	1A	PCV-2b	EF565358	1A	PCV-2b
DQ220737	1A	PCV-2b	EF565359	1A	PCV-2b
DQ220738	1A	PCV-2b	EF565361	1A	PCV-2b
DQ220739	1A	PCV-2b	EF565362	1A	PCV-2b
DQ233257	1A	PCV-2b	EF565363	1A	PCV-2b
DQ364650	1A	PCV-2b	EF565364	1A	PCV-2b
DQ629115	1A	PCV-2b	EF565365	1A	PCV-2b
DQ629116	1A	PCV-2b	EF565366	1A	PCV-2b
DQ629117	1A	PCV-2b	EF565367	1A	PCV-2b
DQ629118	1A	PCV-2b	EF565368	1A	PCV-2b
DQ629119	1A	PCV-2b	EF675234	1A	PCV-2b
DQ648031	1A	PCV-2b	EF675235	1A	PCV-2b
DQ910866	1A	PCV-2b	EU057185	1A	PCV-2b
DQ915583	1A	PCV-2b	EU136712	1A	PCV-2b
DQ915587	1A	PCV-2b	EU136713	1A	PCV-2b
DQ923523	1A	PCV-2b	EU136714	1A	PCV-2b
DQ923524	1A	PCV-2b	EU136715	1A	PCV-2b
EF394777	1A	PCV-2b	EU136716	1A	PCV-2b
EF394778	1A	PCV-2b	EU136718	1A	PCV-2b
EF394779	1A	PCV-2b	EU136719	1A	PCV-2b
EF421969	1A	PCV-2b	EU136720	1A	PCV-2b
EF421973	1A	PCV-2b	EU257513	1A	PCV-2b
EF452350	1A	PCV-2b	EU340257	1A	PCV-2b
EF452351	1A	PCV-2b	EU340258	1A	PCV-2b
EF458306	1A	PCV-2b	EU450584	1A	PCV-2b
EF493840	1A	PCV-2b	EU450585	1A	PCV-2b
EF524516	1A	PCV-2b	EU450586	1A	PCV-2b
EF524519	1A	PCV-2b	EU450587	1A	PCV-2b
EF524520	1A	PCV-2b	EU450588	1A	PCV-2b
EF524521	1A	PCV-2b	EU450589	1A	PCV-2b
EF524522	1A	PCV-2b	EU450590	1A	PCV-2b
EF524528	1A	PCV-2b	EU503031	1A	PCV-2b
EF565342	1A	PCV-2b	EU503032	1A	PCV-2b
EF565343	1A	PCV-2b	EU503035	1A	PCV-2b
EF565344	1A	PCV-2b	EU545542	1A	PCV-2b
EF565345	1A	PCV-2b	EU545543	1A	PCV-2b
EF565346	1A	PCV-2b	EU545544	1A	PCV-2b
EF565347	1A	PCV-2b	EU545545	1A	PCV-2b
EF565348	1A	PCV-2b	EU545546	1A	PCV-2b
EF565349	1A	PCV-2b	EU545547	1A	PCV-2b

Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos	Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos
EU545548	1A	PCV-2b	EF675238	1B	PCV-2b
EU545549	1A	PCV-2b	EF675240	1B	PCV-2b
EU545550	1A	PCV-2b	EF675243	1B	PCV-2b
EU545551	1A	PCV-2b	EU095020	1B	PCV-2b
EU589463	1A	PCV-2b	EU257512	1B	PCV-2b
EU594437	1A	PCV-2b	EU257514	1B	PCV-2b
EU594438	1A	PCV-2b	EU366323	1B	PCV-2b
EU594439	1A	PCV-2b	EU366324	1B	PCV-2b
EU594440	1A	PCV-2b	EU366325	1B	PCV-2b
EU684164	1A	PCV-2b	EU366326	1B	PCV-2b
EU886637	1A	PCV-2b	EU647557	1B	PCV-2b
FJ158605	1A	PCV-2b	EU780073	1B	PCV-2b
FJ158606	1A	PCV-2b	EU921255	1B	PCV-2b
FJ233905	1A	PCV-2b	EU921256	1B	PCV-2b
FJ233906	1A	PCV-2b	EU921257	1B	PCV-2b
FJ233907	1A	PCV-2b	FJ041151	1B	PCV-2b
FJ233910	1A	PCV-2b	FJ608538	1B	PCV-2b
FJ501957	1A	PCV-2a	FJ608539	1B	PCV-2b
FJ644561	1A	PCV-2b	FJ608540	1B	PCV-2b
FJ644563	1A	PCV-2b	FJ608542	1B	PCV-2b
FJ667584	1A	PCV-2b	FJ608543	1B	PCV-2b
FJ667594	1A	PCV-2b	FJ608544	1B	PCV-2b
FJ667595	1A	PCV-2b	FJ608546	1B	PCV-2b
FJ716703	1A	PCV-2b	FJ608549	1B	PCV-2b
FJ716704	1A	PCV-2b	FJ644922	1B	PCV-2b
FJ905462	1A	PCV-2b	FJ667587	1B	PCV-2b
FJ905464	1A	PCV-2b	FJ667592	1B	PCV-2b
FJ905466	1A	PCV-2b	FJ870969	1B	PCV-2b
FJ935780	1A	PCV-2b	FJ870974	1B	PCV-2b
FN398022	1A	PCV-2b	AY181947*	1C	PCV-2b
FN398023	1A	PCV-2b	AY291317*	1C	PCV-2b
FN398024	1A	PCV-2b	AY556473*	1C	PCV-2b
FN398025	1A	PCV-2b	AY556476*	1C	PCV-2b
FN398027	1A	PCV-2b	AY682991*	1C	PCV-2b
GQ227412	1A	PCV-2b	AY686763*	1C	PCV-2b
AY556475*	1B	PCV-2b	AY943819*	1C	PCV-2b
AY682995*	1B	PCV-2b	DQ201640	1C	PCV-2b
AY691169*	1B	PCV-2b	DQ206444	1C	PCV-2b
DQ180393	1B	PCV-2b	EF675230	1C	PCV-2b
DQ195679	1B	PCV-2b	FJ158607	1C	PCV-2b
DQ910865	1B	PCV-2b	FJ594471	1C	PCV-2b
DQ997817	1B	PCV-2b	FJ644929	1C	PCV-2b
EF421972	1B	PCV-2b	FJ667583	1C	PCV-2b
EF524525	1B	PCV-2b	FJ667588	1C	PCV-2b
EF524530	1B	PCV-2b	FJ712216	1C	PCV-2b
EF524535	1B	PCV-2b	FJ870970	1C	PCV-2b
EF675233	1B	PCV-2b	FJ870973	1C	PCV-2b

Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos	Código do GenBank	Classificação em subgrupos	Classificação em genótipos
AY556474	2-	PCV-2a	AF027217	2E	PCV-2a
EF524533	2-	PCV-2a	AF055392	2E	PCV-2a
FJ660969	2-	PCV-2a	AF085695	2E	PCV-2a
AB072302*	2A	PCV-2a	AF086834	2E	PCV-2a
AF109398	2A	PCV-2a	AF086835	2E	PCV-2a
AF117753	2A	PCV-2a	AF086836	2E	PCV-2a
AF201307	2A	PCV-2a	AF112862	2E	PCV-2a
AY146992	2A	PCV-2a	AF118095*	2E	PCV-2a
AY754016	2A	PCV-2a	AF118097*	2E	PCV-2a
AY754017	2A	PCV-2a	AF264038*	2E	PCV-2a
AY754018	2A	PCV-2a	AF264039*	2E	PCV-2a
AY754019	2A	PCV-2a	AF264040*	2E	PCV-2a
AY754020	2A	PCV-2a	AF264041*	2E	PCV-2a
AY754021	2A	PCV-2a	AF264042*	2E	PCV-2a
AY874164	2A	PCV-2a	AF381175*	2E	PCV-2a
AY874169	2A	PCV-2a	AF381177*	2E	PCV-2a
EU136711	2A	PCV-2a	AF408635*	2E	PCV-2a
EU148507	2A	PCV-2a	AF454546*	2E	PCV-2a
EU886638	2A	PCV-2a	AF465211*	2E	PCV-2a
AB426905	2B	PCV-2a	AF520783*	2E	PCV-2a
AF154679	2B	PCV-2a	AF544024*	2E	PCV-2a
AF166528	2B	PCV-2a	AY094619*	2E	PCV-2a
AF364094*	2B	PCV-2a	AY181948*	2E	PCV-2a
AY146991*	2B	PCV-2a	AY325495*	2E	PCV-2a
AY146993*	2B	PCV-2a	AY699793*	2E	PCV-2a
AY180396*	2B	PCV-2a	AY754022	2E	PCV-2a
AY180397*	2B	PCV-2a	DQ104421*	2E	PCV-2a
AF201308*	2C	PCV-2a	DQ104423*	2E	PCV-2a
AF201309*	2C	PCV-2a	DQ629113	2E	PCV-2a
AF201310*	2C	PCV-2a	DQ629114	2E	PCV-2a
AF109399*	2D	PCV-2a	EF394774	2E	PCV-2a
AF201305*	2D	PCV-2a	EF394775	2E	PCV-2a
AF201306*	2D	PCV-2a	EF394776	2E	PCV-2a
AF264043*	2D	PCV-2a	EF452352	2E	PCV-2a
AF381176*	2D	PCV-2a	EF452353	2E	PCV-2a
AY288135*	2D	PCV-2a	EF524518	2E	PCV-2a
AY322004*	2D	PCV-2a	EF524538	2E	PCV-2a
AY424401*	2D	PCV-2a	EF524540	2E	PCV-2a
AY424402*	2D	PCV-2a	EF524542	2E	PCV-2a
AY424403*	2D	PCV-2a	EU057184	2E	PCV-2a
AY874165	2D	PCV-2a	EU057187	2E	PCV-2a
AY874166	2D	PCV-2a	EU057188	2E	PCV-2a
DQ870484	2D	PCV-2a	EU057189	2E	PCV-2a
DQ915588	2D	PCV-2a	EU450591	2E	PCV-2a
EU057186	2D	PCV-2a	FJ218001	2E	PCV-2a
AB072301*	2E	PCV-2a	FJ218002	2E	PCV-2a
AB072303*	2E	PCV-2a	FJ233908	2E	PCV-2a

CAPÍTULO 3

Tropeçando em patógeno emergente em todo o mundo: uma abordagem filogeográfica do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) considerando o mercado mundial.

3.1. INTRODUÇÃO

A emergência de agentes infecciosos tem acompanhado a história evolutiva do homem e o processo de domesticação dos animais. Nos últimos 50 anos, o rebanho mundial aumentou significativamente com o desenvolvimento dos sistemas intensivos de produção animal em escala industrial, sendo registrado um crescimento de 60% na produção animal entre os anos de 1960 e 2000 (Tilman *et al.*, 2002). Paralelamente, o processo de integração econômica dos mercados mundiais tornou mais intenso o trânsito de animais e produtos derivados entre os países. Juntos, estes dois fatores têm contribuído para a disseminação e a emergência de agentes infecciosos de animais em diferentes regiões do mundo.

O suíno foi um dos primeiros animais a ser domesticado pelo homem (Larson *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), o que contribuiu para tornar a carne suína uma das principais fontes protéicas da dieta humana no mundo, com um consumo *per capita* de 15,22 kg por ano (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>; acessado em 5 de abril de 2010). Além da importância econômica, a produção de suínos recebe grande atenção no estudo epidemiológico de vírus que também afetam os humanos porque os suínos podem atuar como reservatórios de diversos patógenos zoonóticos emergentes como, por exemplo, o vírus Influenza (Nichol *et al.*, 2000; Morris, 2009).

Os agentes infecciosos de suínos têm recebido grande atenção desde o início da década de 90, quando vários países produtores acumularam perdas econômicas significativas devido a agentes patogênicos emergentes como o *Porcine circovirus-2* (PCV-2). O *Porcine circovirus-2* é um vírus classificado na família *Circoviridae* e foi caracterizado como um agente causador da *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) (Meehan *et al.*, 1998), estando associado a um conjunto de diferentes síndromes em suínos denominado *Porcine Circovirus Associated Diseases* (PCVAD) (Opriessnig *et al.*, 2007; Madec *et al.*, 2008; Ramamoorthy e Meng, 2009).

O PCV-2 é um vírus não envelopado com um genoma ambisenso composto por DNA circular fita simples de ~1.76kb, possuindo três *Open Reading Frames* (ORFs) que codificam produtos protéicos já identificados e caracterizados. A ORF1 codifica duas proteínas (rep e rep') envolvidas na replicação viral (Mankertz *et al.*, 2004); a ORF2 codifica a proteína estrutural (cap) do capsídeo viral (Hamel *et al.*, 1998); e a

ORF3 codifica uma proteína envolvida na indução da apoptose celular (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

Desde a sua identificação e caracterização, o PCV-2 alcançou uma distribuição mundial, sendo a PMWS, descrita inicialmente no oeste do Canadá no ano de 1991 (Harding e Clark, 1997), uma síndrome endêmica na maioria dos países produtores e atualmente considerada a principal causa por perdas nas granjas (Madec *et al.*, 2008; Ramamoorthy e Meng, 2009). O impacto econômico das PCVAD nos países produtores tem estimulado estudos para a compreensão dos mecanismos evolutivos e epidemiológicos do PCV-2 (Larochelle *et al.*, 2002; Olvera *et al.*, 2007; Timmusk *et al.*, 2008; Chiarelli-Neto *et al.*, 2009; Firth *et al.*, 2009).

Baseados em estudos filogenéticos, um modelo de classificação para o PCV-2 foi proposto, dividindo-o em três grandes grupos, genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2c (Segales *et al.*, 2008). Apesar desses três genótipos do PCV-2 serem capazes de produzir a PMWS, diversos estudos têm demonstrado que os isolados provenientes de animais que apresentam a PMWS são mais frequentemente incluídos no genótipo PCV-2b, enquanto que isolados provenientes de animais que não apresentam a doença são incluídos no PCV-2a (An *et al.*, 2007; Grau-Roma *et al.*, 2008).

As abordagens filogeográficas e filogenéticas têm se tornado estratégias interessantes para o estudo da epidemiologia de agentes infecciosos a partir de sequências moleculares, uma vez que essas abordagens permitem elucidar o processo evolutivo dos patógenos e também estabelecer um padrão de dispersão dos mesmos em um contexto histórico e geográfico (Avice, 2000; Felsenstein, 2003).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar as principais vias de dispersão do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) entre os países produtores de suínos, utilizando abordagens filogeográficas e filogenéticas, correlacionando-as com as estatísticas do comércio mundial de suínos vivos.

3.2. METODOLOGIA

Neste trabalho, todos os dados analisados foram obtidos em bancos de dados públicos e os aplicativos computacionais utilizados são de livre utilização. As metodologias aplicadas para a organização do conjunto de dados e a realização das análises filogenéticas e filogeográficas estão representadas na Figura 3.1 e descritas em detalhes nos tópicos a seguir.

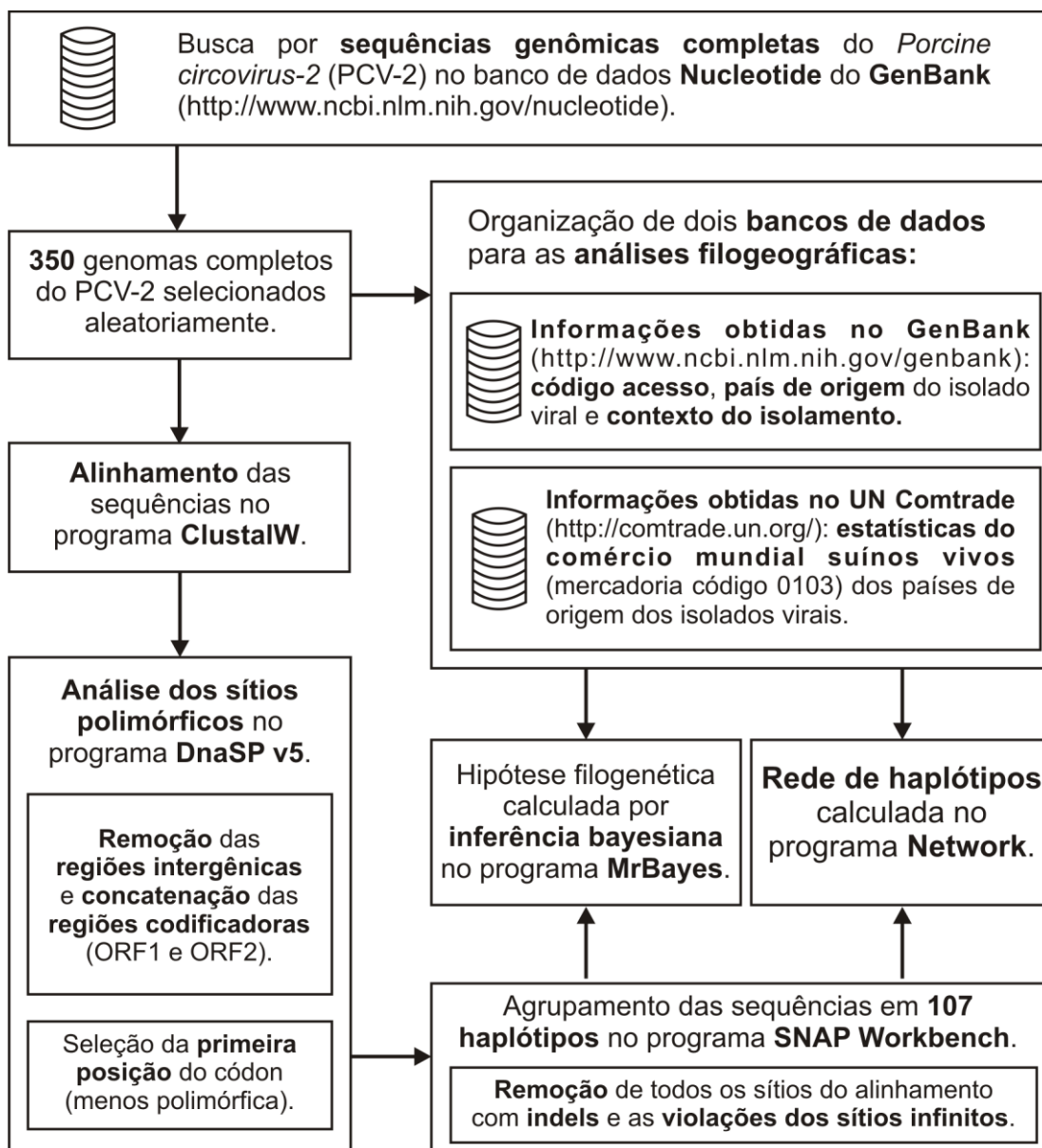


Figura 3.1. Representação esquemática das metodologias utilizadas para analisar as vias de dispersão *Porcine circovirus-2* (PCV-2).

3.2.1. Organização do conjunto de dados e agrupamento das sequências em haplótipos

Para as análises filogenéticas e filogeográficas do *Porcine circovirus-2* (PCV-2), foram utilizadas as sequências genômicas do PCV-2 disponíveis no banco de dados Nucleotide do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>; acessado em 01 de junho de 2010). Foram selecionadas aleatoriamente 350 sequências genômicas completas (Tabela S3.1. Material Suplementar) e essas sequências foram alinhadas no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), utilizando as configurações padrões para a abertura e extensão dos *gaps*.

A partir desse conjunto de dados, os polimorfismos das sequências foram analisados utilizando o programa DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009) e foram encontrados 701 sítios polimórficos, correspondendo a 39,6% do genoma do PCV-2. Essa elevada frequência de mutações nas sequências genômicas do PCV-2 poderia interferir no estabelecimento das relações genealógicas entre os isolados virais nas análises filogenéticas e filogeográficas, impossibilitando identificar os caminhos seguidos pela evolução ao longo das gerações de linhagens virais.

Para remover a interferência desse número excessivo de polimorfismos, utilizou-se como estratégia a remoção das regiões intergênicas e a concatenação das ORF1 e ORF2. A ORF3 não foi selecionada porque ela está sobreposta à ORF1 no genoma do PCV-2 e a sua utilização faria com que uma mesma região do genoma estivesse duplicada nas análises. As duas ORFs foram colocadas em *tandem* (ORF1-ORF2) e os polimorfismos presentes em cada uma das três posições de códons dessas ORFs foram analisados no programa DnaSP. A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.1, os sítios correspondentes às posições do 1º códon nas sequências concatenadas das ORF1 e ORF2 foram selecionados e o número de sítios polimórficos no conjunto de sequências foi reduzido de 701 para 154.

Em seguida, as sequências foram agrupadas em haplótipos (grupos de sequências com 100% de identidade) utilizando o programa SNAP Workbench Version 2.0 (Price e Carbone, 2005; Aylor *et al.*, 2006). Nesse programa, as posições do alinhamento com *indels* e as violações do modelo de sítios infinitos (Kimura, 1969), posições com múltiplas mutações, foram removidas e as 350 sequências do PCV-2 foram agrupadas em 107 haplótipos (Tabela S3.1. Material Suplementar).

Tabela 3.1 Sítios polimórficos presentes nas sequências concatenadas (ORF1-ORF2).

Sequências analisadas	Número de sítios polimórficos
1º códon	154
2º códon	168
3º códon	337
Sequência completa (ORF1-ORF2)	659

3.2.2. Informações sobre isolados virais e estatísticas econômicas

Dois bancos de dados foram criados para dar suporte às análises filogenéticas e filogeográficas. No primeiro banco de dados, foram reunidas todas as informações disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; acessado em 01 de junho de 2010) sobre as 350 sequências genômicas do PCV-2 selecionadas no banco de dados Nucleotide. Essas informações incluem: o código de acesso no GenBank, o país de origem do isolado viral, a data do isolamento viral e os artigos publicados relacionados com o isolado viral.

O segundo banco de dados foi organizado para estabelecer um contexto econômico às análises filogeográficas. Foram analisadas as estatísticas do comércio mundial de suínos vivos (mercadoria código 0103) disponíveis no *United Nations Commodity Trade Statistics Database, UN Comtrade DESA/UNSD* (<http://comtrade.un.org/>; acessado em 1 de junho de 2010) dos países de origem dos isolados virais do PCV-2. No *UN Comtrade*, estão disponíveis as estatísticas anuais das exportações e importações realizadas pelos países a partir do início da década de 90, período no qual o PCV-2 alcançou distribuição mundial.

3.2.3. Análises filogenéticas e filogeográficas

Uma hipótese filogenética foi calculada por inferência bayesiana utilizando o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). Para agilizar a construção das árvores filogenéticas, um modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado utilizando o programa MrModeltest (Nylander *et al.*, 2004). Essa abordagem forneceu ao programa MrBayes os parâmetros a serem estimados, evitando o excesso de parâmetros dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e dos tamanhos

dos ramos. As árvores filogenéticas foram calculadas no MrBayes pelo método de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e utilizando os parâmetros listados na Tabela 3.2. O haplótipo H1 (EU148503), representante do genótipo PCV-2c, foi definido como grupo externo.

A árvore filogenética consenso (Figura 3.2) foi editada utilizando o programa FigTree Version1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) e os haplótipos foram agrupados de acordo com o modelo de classificação do PCV-2 proposto por Segales *et al.* (2008).

Tabela 3.2 Parâmetros do programa MrBayes utilizados na análise MCMC.

Parâmetro	Valor
Frequência de amostragem das árvores (<i>samplefreq</i>)	1000
Números de corridas independentes (<i>nruns</i>)	4
Números de cadeias (<i>nchains</i>)	4
Números de gerações (<i>ngen</i>)	50000000
Número de amostras descartadas (<i>burnin</i>)*	12500

*No MrBayes, a topologia e os valores de probabilidade posterior da árvore filogenética consenso são calculados considerando-se as árvores filogenéticas amostradas na fase estacionária da distribuição de probabilidade *a posteriori* e descartando as árvores filogenéticas amostradas na fase não estacionária. O parâmetro *burnin* representa as árvores filogenéticas que são descartadas e o seu valor padrão corresponde à parcela de 25% do total de árvores amostradas.

Para representar a distribuição geográfica e as relações genealógicas entre os haplótipos do PCV-2, uma rede de haplótipos foi calculada no programa Network 4.5.1.6 (<http://www.fluxus-technology.com>) a partir do algoritmo de *Median Joining* (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999), utilizando as configurações padrões do programa.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Análises filogenéticas

Na árvore filogenética (Figura 3.2), os 107 haplótipos do PCV-2 foram agrupados conforme o modelo de classificação proposto por Segales *et al.* (2008). Esses haplótipos correspondem a um conjunto de 350 sequências de isolados virais de PCV-2 originados de sete regiões geográficas (África, América do Norte, América do Sul, Ásia, Caribe, Europa e Oceania) e vinte e dois países (África do Sul, Alemanha, Argentina, Austrália, Áustria, Brasil, Canadá, China, Coreia do Sul, Cuba, Dinamarca, Eslováquia, Espanha, Estados Unidos, França, Grécia, Holanda, Hungria, Indonésia, Japão, Romênia e Taiwan).

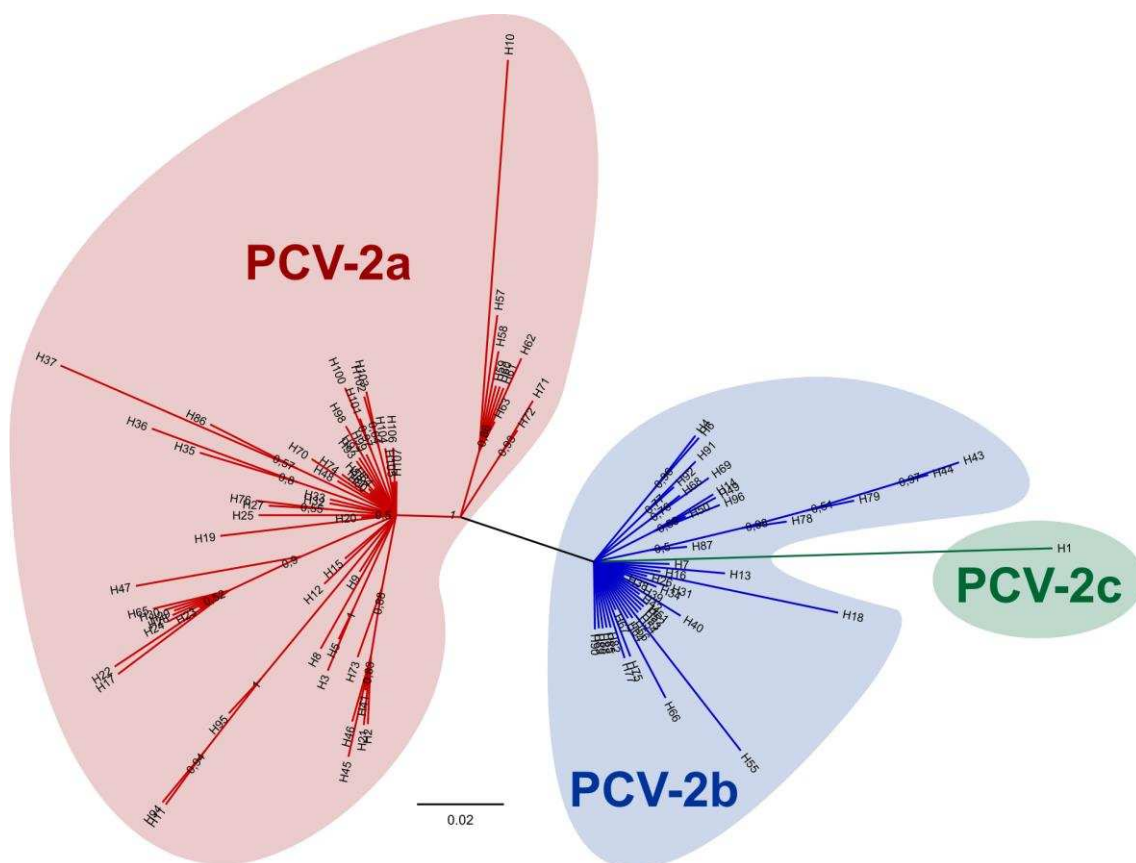


Figura 3.2. Classificação filogenética dos haplótipos do PCV-2. Árvore filogenética consenso dos 107 haplótipos do PCV-2 obtida por Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade posteriores calculados pelo programa MrBayes estão indicados ao lado de cada nó. Os ramos da árvore filogenética foram agrupados de acordo com o modelo de classificação proposto por Segales *et al.*(2008). O haplótipo H1 (sequência EU148503, PCV-2c) foi selecionado como grupo externo.

Dos 350 isolados virais do PCV-2, 95 (27,1%) foram classificados no genótipo PCV-2a, 254 (72,6%) no genótipo PCV-2b e 1 (0,3%) no genótipo PCV-2c. A classificação filogenética dos haplótipos do PCV-2 está detalhada na Tabela S3.1 (Material Suplementar) e resumida na Tabela 3.3.

Os isolados virais do PCV-2 classificados nos genótipos PCV-2a e PCV-2b estão distribuídos entre os países da América do Norte, América do Sul, Ásia, Europa e Oceania. Na África foi identificado somente um isolado viral classificado no genótipo PCV-2a e no Caribe foram identificados somente isolados virais do genótipo PCV-2b.

Entre os países, a China é o país de origem do maior número de isolados virais de PCV-2 (n=129; 36,9%), 15 do genótipo PCV-2a e 114 do genótipo PCV-2b. Na África do Sul, Alemanha, Espanha, Japão e Taiwan foram identificados somente isolados do genótipo PCV-2a. Na Argentina, Cuba, Eslováquia, Holanda, Indonésia, e Romênia foram identificados apenas isolados do genótipo PCV-2b. O isolado viral EU148503, identificado na Dinamarca, é o único representante do genótipo PCV-2c.

3.3.2. Análises filogeográficas

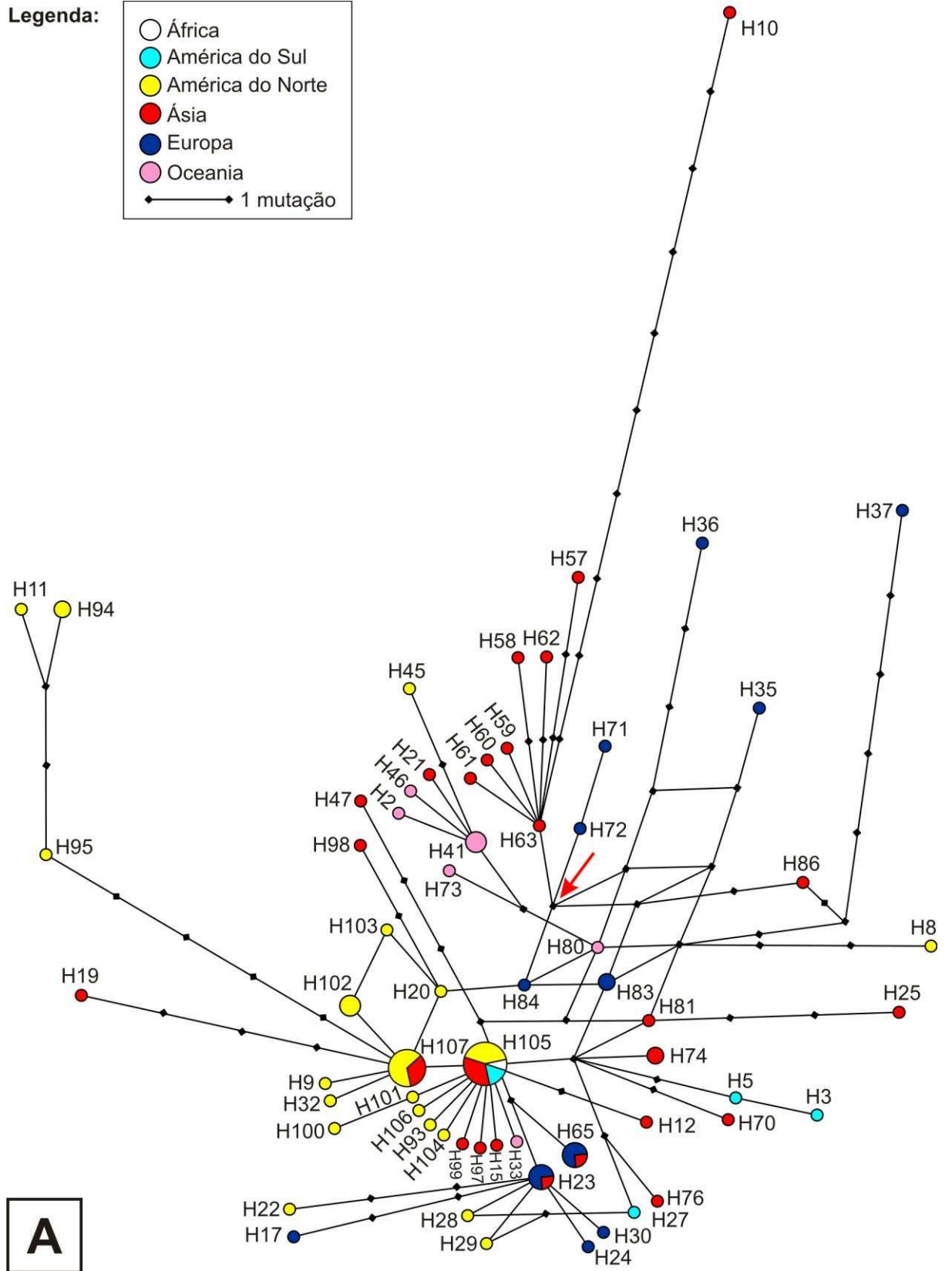
Na rede obtida (Figura 3.3), os haplótipos foram identificados conforme a origem geográfica e separados em sete grupos: África, América do Norte, América do Sul, Ásia, Caribe, Europa e Oceania. Também foi possível agrupar os 107 haplótipos conforme o modelo de classificação proposto para o PCV-2 (Segales *et al.*, 2008). A parcela da rede que agrupou os haplótipos do genótipo PCV-2a está representada na Figura 3.3A e a parcela que agrupou os haplótipos do genótipo PCV-2b e o único representante do genótipo PCV-2c está representada na Figura 3.3B.

No genótipo PCV-2a (Figura 3.3A) não é possível definir um único haplótipo ancestral que originou os demais isolados virais na rede de haplótipos. Por outro lado, o haplótipo H38 é o ancestral de todos os isolados do PCV-2 classificados no genótipo PCV-2b (Figura 3.3B). Nesse haplótipo está incluído o isolado AF055394, primeiro representante do genótipo PCV-2b que foi isolado e sequenciado, a partir de amostras de suínos originadas da França (Meehan *et al.*, 1998).

Tabela 3.3. Resumo da classificação filogenética dos isolados do PCV-2.

		Classificação filogenética do PCV-2		
Região geográfica	País	PCV-2a	PCV-2b	PCV-2c
África	África do Sul	1	-	-
América do Norte	Canadá	17	21	-
América do Norte	Estados Unidos	15	13	-
América do Sul	Argentina	-	1	-
América do Sul	Brasil	5	4	-
Ásia	China	15	114	-
Ásia	Coréia do Sul	4	12	-
Ásia	Indonésia	-	2	-
Ásia	Japão	4	-	-
Ásia	Taiwan	9	-	-
Caribe	Cuba	-	5	-
Europa	Alemanha	3	-	-
Europa	Áustria	3	2	-
Europa	Dinamarca	2	35	1
Europa	Eslováquia	-	10	-
Europa	Espanha	3	-	-
Europa	França	1	19	-
Europa	Grécia	1	2	-
Europa	Holanda	-	9	-
Europa	Hungria	4	2	-
Europa	Romênia	-	1	-
Oceania	Austrália	8	2	-
Total		95 (27,1%)	254 (72,6%)	1 (0,3%)

Legenda:



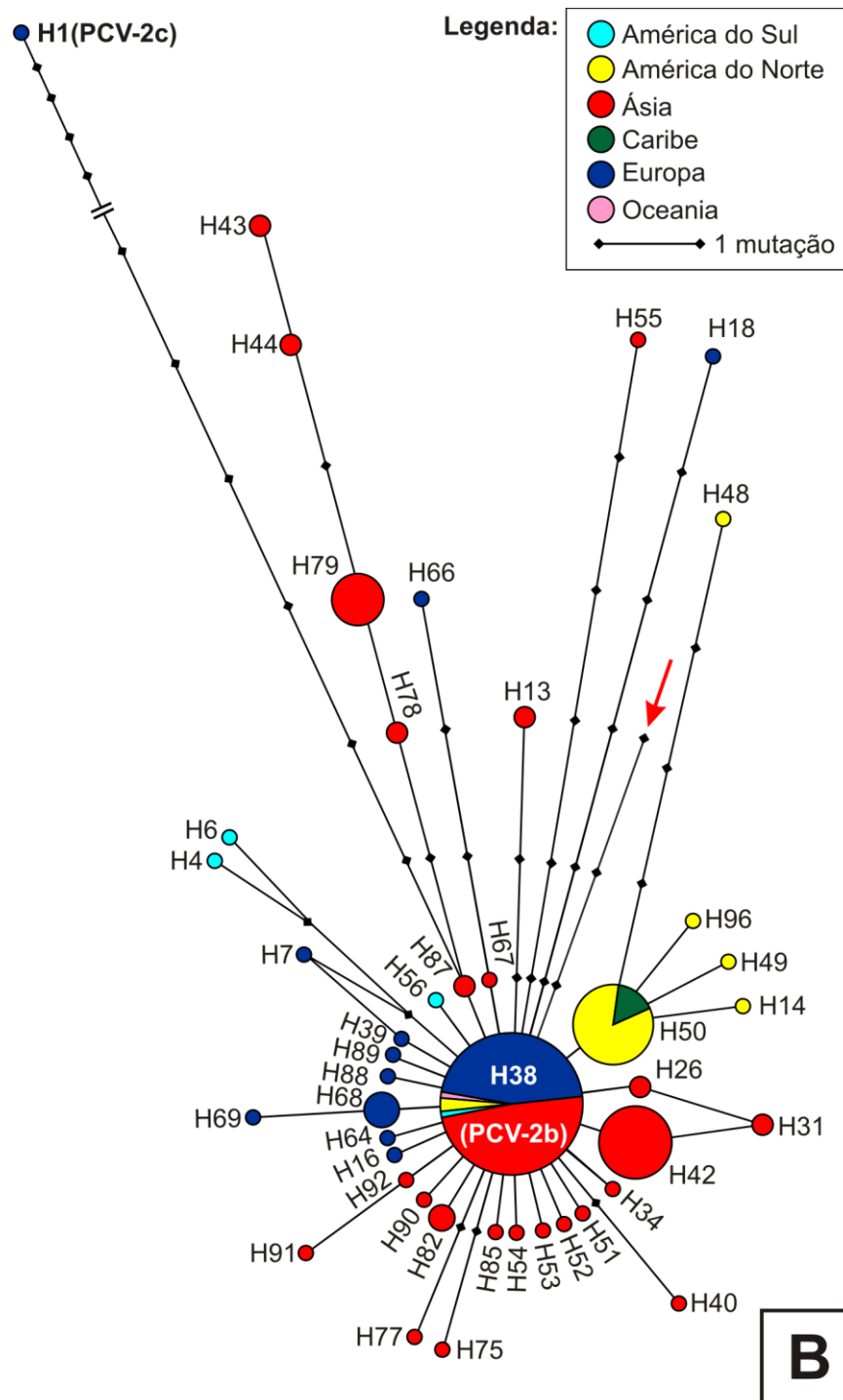


Figura 3.3. Rede de haplótipos do PCV-2. Rede de haplótipos construída com o algoritmo *Median Joining* (MJ) utilizando o programa Network 4.5.1.0. O tamanho da circunferência é proporcional à frequência dos haplótipos e o tamanho dos braços da rede é proporcional ao número de mutações que separam os haplótipos. **3.3A.** Rede dos haplótipos classificados no genótipo PCV-2a. **3.3B.** Rede dos haplótipos classificados nos genótipos PCV-2b e PCV-2c. As duas setas vermelhas indicam o ponto de conexão entre as duas redes de haplótipos.

Sete haplótipos agruparam isolados virais de PCV-2 originados de países diferentes (Figura 3.3, Tabela 3.4). Esses haplótipos ocupam posições centrais na rede e se apresentam como os haplótipos ancestrais que originaram as demais linhagens virais. Dessa maneira, esses haplótipos possivelmente estão relacionados aos eventos de introdução e dispersão do PCV-2 entre os países produtores de suínos.

Tabela 3.4. Haplótipos que agruparam isolados virais do PCV-2 originados de países diferentes.

Haplótipo*	Frequência	Genótipo	Região geográfica (países de origem)
H23	4	PCV-2a	Ásia (China) e Europa (Alemanha e França).
H38	132	PCV-2b	América do Norte (Canadá e Estados Unidos), América do Sul (Brasil), Ásia (China e Coréia do Sul), Europa (Áustria, Dinamarca, Eslováquia, França, Holanda e Hungria) e Oceania (Austrália).
H50	31	PCV-2b	América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e Caribe (Cuba).
H65	4	PCV-2a	Ásia (China) e Europa (Áustria).
H68	7	PCV-2b	Europa (Eslováquia, França e Romênia).
H105	12	PCV-2a	África (África do Sul), América do Norte (Canadá e Estados Unidos), América do Sul (Brasil) e Ásia (China e Coréia do Sul).
H107	9	PCV-2a	América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e Ásia (China e Japão).

* Os códigos de acesso das sequências dos isolados virais no GenBank estão listados na Tabela S3.1 (Material Suplementar).

Para representar as vias de dispersão do PCV-2 entre os países, as rotas previstas na rede de haplótipos (Figura 3.3) foram inseridas em um mapa (Figura 3.4), dando uma idéia da distribuição geográfica do PCV-2. Nesse mapa, observam-se as principais vias de dispersão do PCV-2 entre as regiões geográficas: América do Norte → África, América do Norte → América do Sul, América do Norte → Caribe, Europa → América do Norte, Europa → América do Sul, Europa → Ásia, Oceania → Ásia e Oceania → América do Norte.

O sentido dessas vias de dispersão, e de todas as outras rotas representadas na Figura 3.4, obtidas na rede de haplótipos, foi estabelecido em um contexto epidemiológico e econômico, analisando-se a história dos isolados virais do PCV-2 e as estatísticas do comércio mundial de suínos vivos (mercadoria código 0103) disponíveis no *United Nations Commodity Trade Statistics Database, UN Comtrade*. Nesse contexto, foram consideradas as publicações sobre o isolamento viral e os históricos de importação e exportação de suínos vivos de todos os países listados na Tabela 3.4. As estatísticas econômicas desses países estão resumidas na Tabela S3.2 (Material Suplementar).

A maioria dos haplótipos da Europa foi incluída no genótipo PCV-2b (Figura 3.3B, Tabela 3.3). O haplótipo H38 foi isolado na Áustria, Eslováquia, França, Holanda e Hungria, representando a principal via de introdução e dispersão do vírus no continente. Esse haplótipo também foi identificado na América do Norte, América do Sul, Ásia e Oceania (Tabela 3.4). No genótipo PCV-2a, os principais haplótipos ancestrais são os haplótipos H83 e H84, isolados na Espanha, e o haplótipo H23, isolado na Alemanha e na França, que também foi identificado na Ásia. O haplótipo H1, por sua vez, é o único representante do genótipo PCV-2c e está separado por muitos passos de mutação dos demais haplótipos.

Na Ásia, a maioria dos haplótipos foi incluída no genótipo PCV-2b (Figura 3.3B, Tabela 3.3). O haplótipo H38 foi isolado na China e na Coreia do Sul e se apresenta como a principal via de introdução e dispersão do vírus no continente. No genótipo PCV-2a (Figura 3.3B, Tabela 3.3), os principais haplótipos ancestrais dos isolados virais asiáticos são o haplótipo H63, isolado em Taiwan, o haplótipo H105, isolado na China e na Coreia do Sul e o haplótipo H107, isolado na China e no Japão. O haplótipo H105 também foi identificado na África, América do Norte e América do Sul

e o haplótipo H107 na América do Norte (Tabela 3.4). Além desses haplótipos, outras três vias alternativas de introdução do PCV-2 no continente são observadas. O haplótipo japonês H21 é derivado do haplótipo H41, que foi isolado na Oceania, e os haplótipos chineses H23 e H65 também foram isolados na Europa.

Entre os haplótipos da América do Norte, observa-se a agregação dos isolados virais do genótipo PCV-2b. O haplótipo H38, isolado no Canadá e nos Estados Unidos, representa a principal via de introdução do PCV-2 no continente e é o ancestral dos demais isolados virais norte-americanos. O haplótipo H50 também foi isolado em Cuba e este haplótipo se apresenta como a única via de introdução possível do PCV-2 no Caribe, a partir do Canadá (Figuras 3.3A e 3.4). No genótipo PCV-2a, os haplótipos H105, também isolado na África e na América do Sul, e H107, também isolado na Ásia, são os ancestrais da maioria dos haplótipos norte-americanos e representam as principais vias de introdução do vírus. Outras duas vias alternativas de introdução são observadas a partir dos haplótipos H23 (Ásia e Europa) e H41 (Oceania), que são ancestrais de haplótipos norte-americanos.

O haplótipo sul africano H105 é o único representante da África. Esse haplótipo foi classificado no genótipo PCV-2a e também foi isolado na América do Norte (Canadá e Estados Unidos), na América do Sul (Brasil) e na Ásia (China).

Na América do Sul, os haplótipos classificados nos genótipos PCV-2a e PCV-2b foram introduzidos, respectivamente, a partir dos haplótipos H105 e H38, isolados no Brasil. Esses dois haplótipos são os ancestrais dos demais isolados virais sul-americanos e foram os únicos na América do Sul que também foram identificados em outros países (Tabela 3.4).

Na Oceania, todos os haplótipos são originários da Austrália e a maioria deste foi classificado no genótipo PCV-2a (Figura 3.3A e Tabela 3.3). Esses haplótipos estão agrupados na rede e foram introduzidos a partir do haplótipo H80, cujo ancestral mais provável é o haplótipo H84 que foi isolado na Europa (Espanha). O haplótipo H33, por sua vez, foi introduzido a partir do haplótipo H105 (África, América do Norte, América do Sul e Ásia). No genótipo PCV-2b, o haplótipo H38, que está amplamente disseminado entre os países (Tabela 3.4), também foi identificado na Austrália.

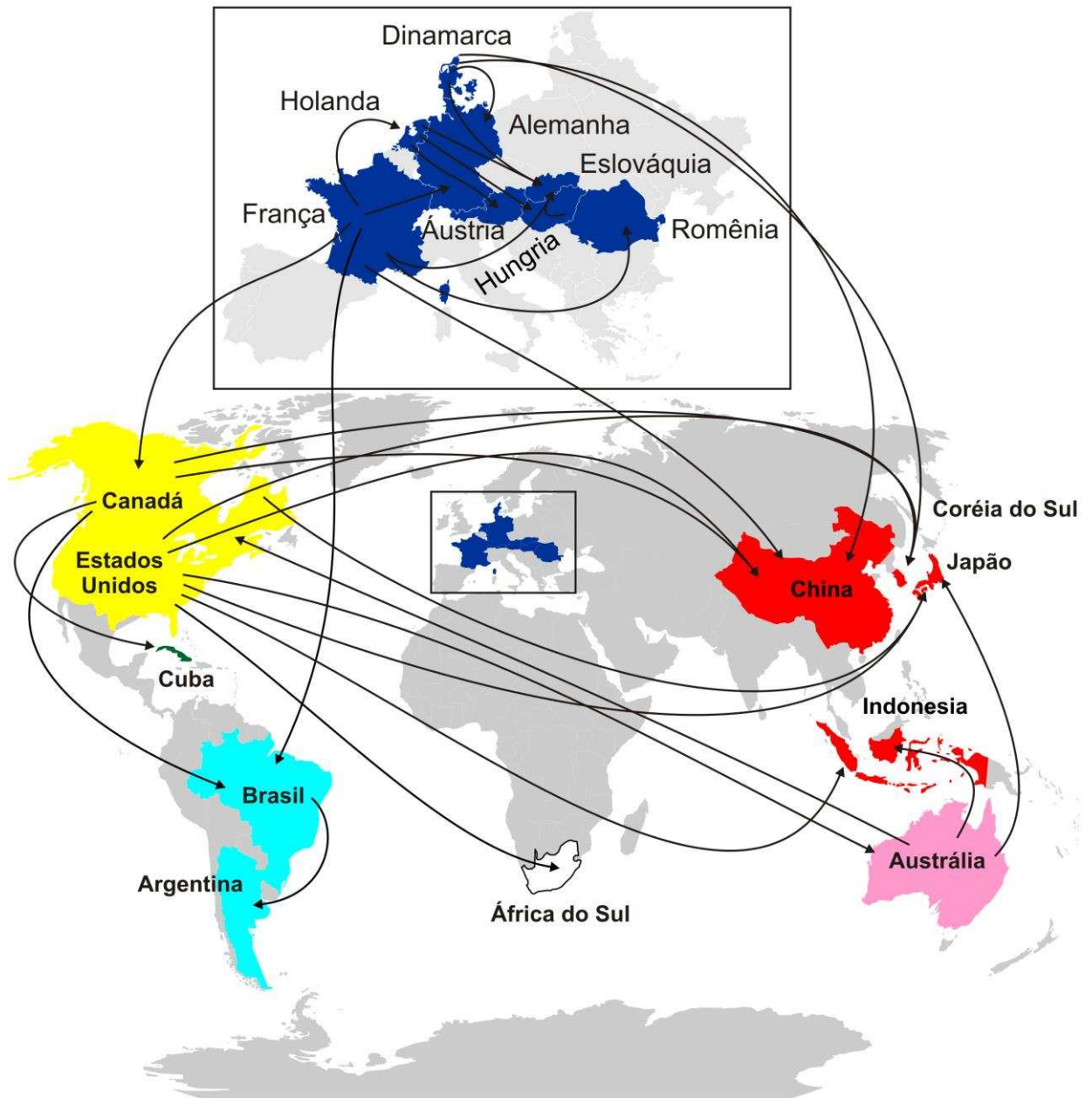


Figura 3.4. Previsão das rotas principais de dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial. Essas rotas foram previstas a partir da rede de haplótipos e das estatísticas do comércio internacional de suínos vivos.

3.4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho lançam uma nova perspectiva sobre a epidemiologia do *Porcine circovirus-2*, predizendo as principais vias de dispersão do PCV-2 entre os países produtores de suínos dentro de um contexto evolutivo e econômico.

A maioria dos isolados virais foi classificada no genótipo PCV-2b (n=374, 79,4%) (Tabela 3.3), que agrupa os isolados de PCV-2 considerados potencialmente mais patogênicos (An *et al.*, 2007; Grau-Roma *et al.*, 2008). Variantes virais mais patogênicas são capazes de causar a doença clínica em um maior número de animais e, possivelmente, serão isoladas com maior frequência e os seus genomas sequenciados, o que pode ter contribuído para essa maior frequência das sequências do genótipo PCV-2b no banco de dados do GenBank.

De acordo com Firth *et al.* (2009), os isolados virais de PCV-2 da América do Sul estariam restritos ao genótipo PCV-2b e os da Austrália (Oceania) estariam restritos ao PCV-2a. Entretanto, os resultados mostraram que as variantes virais do PCV-2 estão amplamente distribuídas entre os países produtores de suínos, sendo encontrados representantes dos genótipos PCV-2a e PCV-2b na Ásia, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania (Figura 3.3 e Tabela 3.3). Essas observações estão consistentes com o descrito por Chiarelli-Neto *et al.* (2009).

Do ponto de vista epidemiológico, os haplótipos que foram isolados em dois ou mais países possivelmente estão envolvidos na dispersão do PCV-2 entre as regiões produtoras de suínos. A predição da dispersão dos haplótipos de PCV-2 entre os países por meio da rede de haplótipos (Figura 3.3) encontrou grande correspondência com as estatísticas do comércio internacional de suínos vivos disponíveis no *United Nations Commodity Trade Statistics Database DESA/UNSD (UN Comtrade)*. Sete haplótipos agruparam isolados virais de PCV-2 originados de países diferentes (Figura 3.3, Tabela 3.4). A partir desses haplótipos, as principais vias de dispersão do PCV-2 entre os países produtores de suínos foram preditas considerando-se as estatísticas do *UN Comtrade* (Figura 3.4, Tabela S3.2).

Nessas vias de dispersão do PCV-2 (Figura 3.4), os principais países de origem das rotas são o Canadá, os Estados Unidos, a Dinamarca, a França e a Holanda. Nesses países estão localizadas sedes de importantes empresas que atuam no melhoramento

genético de suínos, sendo grandes exportadores de animais no comércio internacional de suínos vivos. Dessa forma, os suínos originários desses países podem ter contribuído para a disseminação do PCV-2 entre os países produtores.

Na rede de haplótipos (Figura 3.3), o H38 é o haplótipo mais frequente, agrupando a maioria (n=132, 37,7%) das sequências dos isolados virais analisados, e também é o mais disseminado entre os países. Esse haplótipo foi identificado em 12 países na América do Norte, América do Sul, Ásia, Europa e Oceania (Tabela 3.4). O H38 é o haplótipo que apresentou o maior número de ramificações na rede, sendo o ancestral dos demais isolados virais classificados no genótipo PCV-2b. Por essas razões, o haplótipo H38 pode ser considerado o principal responsável pela disseminação das linhagens virais do genótipo PCV-2b na suinocultura mundial.

Além dessas observações, alguns dos haplótipos do PCV-2 que foram identificados em países diferentes (Tabela 3.4) agruparam isolados virais que possuem um histórico epidemiológico correlacionado. Isolados virais agrupados no haplótipo H38 foram identificados em surtos de PMWS que ocorreram no oeste da França entre os anos 1998 e 2001 (Meehan *et al.*, 1998; De Boisseson *et al.*, 2004), em seguida na Holanda entre os anos 2001 e 2002 (Grierson *et al.*, 2004) e depois na Dinamarca entre os anos 2003 e 2004 (Dupont *et al.*, 2008). No Canadá, um isolado viral agrupado no haplótipo H38 foi identificado em um surto de PMWS que ocorreu em 2005 em Quebec, no qual também foram identificados os isolados virais agrupados no haplótipo H50 (Gagnon *et al.*, 2007). Em seguida, o haplótipo H50 também foi identificado em surto de PMWS que ocorreu em 2007 no estado da Carolina do Norte nos Estados Unidos (Cheung *et al.*, 2007) e o esse haplótipo também está relacionado com os primeiros casos de PMWS registrados em Cuba (Perez *et al.*, 2009).

A introdução e a dispersão do PCV-2 na suinocultura das regiões geográficas consideradas neste trabalho e a correlação desses eventos com o comércio mundial de suínos vivos são discutidas detalhadamente nos tópicos a seguir.

3.4.1. *Introdução e dispersão do PCV-2 na Europa*

Na Europa, o haplótipo H38 é o ancestral de todos os isolados virais classificados no genótipo PCV-2b e é o haplótipo mais disseminado entre os países europeus (Áustria, Dinamarca, Eslováquia, França, Holanda e Hungria) (Figura 3.3B), representando a principal via de dispersão do PCV-2 no continente.

A França foi o primeiro país onde o haplótipo H38 foi isolado e sequenciado (Meehan *et al.*, 1998). Todos os isolados virais originados da França analisados nesse trabalho foram identificados em casos de PWMS que ocorreram no oeste do país entre 1998 e 2002 (Meehan *et al.*, 1998; De Boisseson *et al.*, 2004). Além disso, a França é país europeu de origem do maior número de isolados virais que também foram identificados em outros países (Tabela 3.4). Juntas, essas observações sugerem que o PCV-2 se dispersou na suinocultura européia a partir da França.

Na Holanda, todos os isolados virais foram agrupados no haplótipo H38 e foram identificados em casos de PMWS que ocorreram entre os anos 2001 e 2002 (Grierson *et al.*, 2004). As análises das estatísticas disponíveis no *UN Comtrade* mostram que a Holanda e a França são grandes parceiros no comércio de suínos vivos (Tabela S3.2. Material Suplementar). Entre 1992 e 2009, as exportações de suínos vivos da Holanda para França movimentaram aproximadamente 404,9 milhões de dólares, e, entre 1994 e 2009, as exportações da França para a Holanda movimentaram 129,3 milhões de dólares. Dessa maneira, a introdução do haplótipo H38 na suinocultura holandesa deve ter ocorrido a partir da França.

O haplótipo H38 também foi identificado em casos de PMWS registrados na Dinamarca entre os anos 2003 e 2004 (Dupont *et al.*, 2008; Lohse *et al.*, 2008). Os primeiros surtos de PMWS na Dinamarca foram registrados entre outubro de 2001 e setembro de 2003 (Vigre *et al.*, 2005). As estatísticas do *UN Comtrade* mostram que as exportações totais de suínos vivos realizadas pela Dinamarca sofreram um considerável aumento a partir desse período. As exportações aumentaram de 1,6 bilhões de dólares, entre 1989 e 2000, para 6,2 bilhões de dólares, entre 2002 e 2009. Esse aumento pode ter contribuído para a disseminação do PCV-2 dentro da Europa e da Ásia, uma vez que a Dinamarca é o país europeu que mais exporta suínos vivos para os países asiáticos.

No genótipo PCV-2a, o haplótipo H71 foi introduzido na suinocultura dinamarquesa a partir do haplótipo H72, isolado na Alemanha. A Alemanha é um dos principais países de origem das importações de suínos vivos realizadas pela Dinamarca e as transações comerciais entre os dois países somaram 1,7 milhões de dólares entre 1992 e 2009.

Na Áustria, o haplótipo H38 possivelmente foi introduzido no país a partir da Holanda. De acordo com o *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), as importações de suínos feitas pela Áustria e originadas da Holanda somaram 9,5 milhões de dólares, entre os anos 1995 e 2009.

Na Eslováquia, a primeira evidência da infecção de suínos com sintomas associados à PMWS infectados PCV-2 foi registrada em 2009 (Pistl *et al.*, 2009). Todos os haplótipos originários da Eslováquia foram classificados no genótipo PCV-2b e o haplótipo H38 se apresenta como o ancestral dos demais isolados virais identificados no país. Esse haplótipo também foi identificado na Dinamarca, Holanda e Hungria, que são principais países de origem das importações de suínos vivos feitas pela Eslováquia, e se apresenta como a principal via de introdução do PCV-2 na suinocultura eslovaca. De acordo com *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), as importações originadas da Holanda somaram 10,9 milhões de dólares, entre 1995 e 2008, as importações originadas da Hungria somaram 8 milhões de dólares entre 1994 e 2008, e as importações originadas da Dinamarca somaram 3,8 milhões de dólares entre 1994 e 2008.

Uma segunda via de introdução do PCV-2 na Eslováquia pode ser predita por meio do haplótipo H68, que também foi identificado na França e na Romênia. De acordo com *UN Comtrade*, o haplótipo H68 deve ter sido introduzido a partir da França nas suinoculturas da Eslováquia e da Romênia.

O haplótipo H68 foi identificado na França entre os anos 2000 e 2002 (De Boisseson *et al.*, 2004). De acordo com as estatísticas econômicas do *UN Comtrade*, 23 suínos foram importados da França pela Eslováquia ano de 2002 e essa transação comercial movimentou 2,2 mil dólares. Já o fluxo de animais da França para a Romênia foi muito mais significativo. Entre 2005 e 2009, 77 mil suínos originados da França foram introduzidos na suinocultura romena em transações comerciais que movimentaram 7,3 milhões de dólares.

Na Hungria, 4 haplótipos foram classificados no genótipo PCV-2a e 1 no genótipo PCV-2b. Além disso, esses haplótipos (H24, H30, H35, H36 e H38) foram isolados em javalis entre os anos 2002 e 2003 (Csagola *et al.*, 2006). Do ponto de vista epidemiológico, é possível que os javalis atuem como reservatórios naturais e fontes de infecção para os suínos domésticos na Hungria.

No genótipo PCV-2a, os haplótipos H24 e H30 foram introduzidos a partir do haplótipo H2, que foi isolado na China, Alemanha e França. Não é possível estabelecer uma origem para a introdução dos haplótipos H35 e H36. No genótipo PCV-2b, a introdução do haplótipo H38 ocorreu a partir da Holanda. De acordo com o *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), a Holanda é o principal país de origem das importações húngaras de suínos vivos. As transações comerciais entre Hungria e Holanda somaram 147,6 milhões de dólares, entre os anos 1998 e 2009.

Na Alemanha, os dois haplótipos foram classificados no genótipo PCV-2a. O haplótipo H23 também foi isolado na França e o haplótipo H72 foi introduzido no país a partir do haplótipo H71, isolado na Dinamarca. De acordo com o *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), a Dinamarca e a França estão entre os principais países de origem das importações de suínos vivos feitas pela Alemanha. As importações originadas da Dinamarca somaram 2,6 bilhões de dólares e as originadas da França somaram 109,2 milhões de dólares, entre 1991 e 2009.

Na Grécia, o haplótipo H17 foi classificado no genótipo PCV-2a e foi introduzido no país a partir do haplótipo H23, isolado na Alemanha, França e China. No genótipo PCV-2b, o haplótipo H18 foi introduzido a partir do haplótipo H38, isolado na Dinamarca, França, Holanda e Hungria, e o haplótipo H66 foi introduzido a partir do haplótipo H67, isolado na China.

De acordo com o *UN Comtrade*, a Alemanha (889,5 mil dólares), a Dinamarca (3,9 milhões de dólares) (Tabela S3.2. Material Suplementar), a França (5,6 milhões de dólares), a Holanda (16,1 milhões de dólares) e a Hungria (8,9 milhões de dólares) são os principais países de origem das importações de suínos vivos realizadas pela Grécia.

3.4.2. Introdução e dispersão na Ásia

A China é o país de origem da maioria dos isolados de PCV-2 (n=129; 36,9%) e com o maior número de haplótipos também encontrados em outros países (H23, H38,

H65, H105 e H107). Juntas, essas duas observações permitiriam supor que a China seria um importante centro de disseminação do PCV-2 na suinocultura mundial. Entretanto, as estatísticas econômicas do *UN Comtrade* mostram que a China importa suínos vivos principalmente da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) e Europa (Dinamarca, Reino Unido e França) e exporta para outros países da Ásia. Ou seja, o papel da suinocultura chinesa na dispersão global do PCV-2 entre os países suinocultores pode estar restrito a uma distribuição regional entre os países asiáticos.

No genótipo PCV-2b, todos os isolados virais chineses são descendentes do haplótipo H38. Essa é a principal via de introdução do PCV-2 no país e, analisando as estatísticas das importações de suínos realizadas pela China (Tabela S3.2. Material Suplementar), é mais provável que o haplótipo H38 tenha sido introduzido no país a partir da Dinamarca, da França, do Canadá e dos Estados Unidos.

No genótipo PCV-2a, as vias de introdução do PCV-2 na suinocultura chinesa estão relacionadas aos haplótipos H23, H65, H105 e H107. Todos esses haplótipos também foram isolados em outros países além da China (Tabela 3.4). O haplótipo H23 foi introduzido a partir da Áustria, o H65 a partir da França e os haplótipos H105 e H107 a partir do Canadá e dos Estados Unidos.

De acordo com as estatísticas econômicas do *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), as importações originadas da Dinamarca para a China totalizaram 9,6 milhões de dólares entre 1995 e 2009, as importações originadas da França somaram 3,6 milhões de dólares entre 1998 e 2009, as importações originadas do Canadá somaram 15,7 milhões de dólares e as importações originadas dos Estados Unidos somaram 25,5 milhões de dólares entre 1999 e 2009. No *UN Comtrade* não há registros do comércio de suínos entre a Áustria e a China, mas as transações comerciais relacionadas com a introdução do haplótipo H65 podem ter sido incluídas na categoria genérica “World”. Nessa categoria, as importações de suínos vivos feitas pela China somaram 62 milhões de dólares entre 1992 e 2009.

Em Taiwan, todos os nove haplótipos foram classificados no genótipo PCV-2a e duas vias de introdução são observadas a partir dos haplótipos H63 e H19. O haplótipo H63 é o ancestral dos demais haplótipos encontrados nessa ilha e é descendente do haplótipo espanhol H84. O haplótipo H19, por sua vez, é descendente do haplótipo H107, isolado na China, Japão, Canadá e Estados Unidos. Como a Organização das

Nações Unidas (ONU) não reconhece Taiwan como país, não há registros do comércio de suínos vivos de Taiwan no *UN Comtrade*.

A Coreia do Sul é o segundo país de origem do maior número de isolados virais asiáticos, sendo que 4 isolados foram classificados no genótipo PCV-2a e 12 no PCV-2b (Tabela 3.3). O haplótipo H38 agrupou 8 isolados virais sul-coreanos e é o ancestral dos demais haplótipos classificados no genótipo PCV-2b (Figura 3.3B), sendo essa a principal via de introdução no país. No genótipo PCV-2a, o haplótipo H105 agrupou dois isolados virais sul-coreanos e também é o ancestral dos demais haplótipos (Figura 3.3A), representando a segunda via de introdução do PCV-2 no país. O haplótipo H38 foi introduzido a partir do Canadá, Estados Unidos e Dinamarca e o haplótipo H105 a partir do Canadá e Estados Unidos.

O Canadá, os Estados Unidos e a Dinamarca estão entre os principais países de origem das importações de suínos vivos realizadas pela Coreia do Sul. De acordo com *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), as transações comerciais com o Canadá somaram aproximadamente 12,6 milhões de dólares, entre 1988 e 2009, as transações comerciais com os Estados Unidos somaram 25,3 milhões de dólares, entre 1988 e 2009, e as transações comerciais com a Dinamarca somaram 5,3 milhões de dólares, entre 1990 e 2008.

Na Indonésia, os dois isolados virais agrupados no haplótipo H82 foram introduzidos a partir do haplótipo H38. Esse haplótipo pode ter sido originado da Austrália ou dos Estados Unidos. As importações originadas da Austrália somaram 3,3 milhões de dólares entre 1989 e 2003 e as importações originadas dos Estados Unidos somaram 865,8 mil dólares entre 1989 e 2004 (Tabela S3.2. Material Suplementar).

Por outro lado, o haplótipo H82 está relacionado com a introdução do haplótipo H78 na China. As exportações da Indonésia para a China somaram 57,7 mil dólares entre 1994 e 2006 (Tabela S3.2. Material Suplementar). Além disso, foi relatado que esses isolados virais da Indonésia são originados de uma mesma fazenda e foram os responsáveis pela introdução do PCV-2 em Cingapura (Manokaran *et al.*, 2008). De acordo com as estatísticas do *UN Comtrade*, a Indonésia exporta suínos vivos principalmente para Cingapura e estas estatísticas reforçam estas observações. As transações comerciais entre Indonésia e Cingapura totalizaram aproximadamente 462,3 milhões de dólares entre 1989 e 2009 (Tabela S3.2. Material Suplementar).

No Japão, todos os isolados virais foram classificados no genótipo PCV-2a (Figura 3.3A). O haplótipo H21 foi introduzido no país a partir do haplótipo H41, isolado na Austrália. O haplótipo H61 foi introduzido a partir o haplótipo H63, isolado em Taiwan. O haplótipo H15 foi introduzido a partir do haplótipo H105. O haplótipo H105 e H107 foram originados do Canadá e dos Estados Unidos, principais países de origem das importações de suínos vivos feitas pelo Japão. De acordo com o *UN Comtrade* (Tabela S3.2. Material Suplementar), as importações originadas da Austrália somaram 524,7 mil dólares entre 1999 e 2004, as importações originadas do Canadá somaram 2,06 milhões de dólares entre 1988 e 2009 e as importações originadas dos Estados Unidos somaram 17,2 milhões de dólares entre 1988 e 2009.

3.4.3. Introdução e dispersão na América do Norte e Caribe

Na América do Norte, a análise das estatísticas do comércio de suínos vivos entre o Canadá e os Estados Unidos, no período entre 1989 e 2009, mostra que as exportações de animais do Canadá para os Estados Unidos foram muito mais significativas do que as importações. Nesse período, enquanto que as exportações acumularam um valor de aproximadamente 6,3 bilhões de dólares, as importações somaram aproximadamente 13,4 milhões de dólares (Tabela S3.2. Material Suplementar).

A rede de haplótipos (Figura 3.3) mostra que os haplótipos H38 e H50 representam a principal via de introdução e disseminação dos isolados virais do genótipo PCV-2b na América do Norte. Conforme o descrito anteriormente, esses haplótipos possuem um histórico epidemiológico correlacionado e a rede de haplótipos sugere a introdução do PCV-2 na América do Norte a partir da Europa, por meio do haplótipo H38. Os haplótipos H38 e H50 foram identificados no mesmo surto de PMWS que ocorreu no Canadá em 2005 (Gagnon *et al.*, 2007). Em 2007, o haplótipo H50 também foi identificado em um surto de PMWS que ocorreu nos Estados Unidos (Cheung *et al.*, 2007). Então, considerando as estatísticas comerciais entre Canadá e Estados Unidos e as informações da rede de haplótipos, é mais provável que os eventos de introdução do PCV-2 na América do Norte tenham ocorrido a partir do Canadá e depois em direção aos Estados Unidos.

No genótipo PCV-2a, os haplótipos norte americanos estão mais envolvidos na dispersão do PCV-2, por meio dos haplótipos H105 e H107. Esses dois haplótipos são

os principais ancestrais dos vírus isolados virais norte-americanos. Além desses, duas outras rotas de introdução do PCV-2 no continente também são observadas para o haplótipo H45 (Canadá) e para os haplótipos H22 (Canadá), H28 (Estados Unidos) e H29 (Estados Unidos). O haplótipo H45 foi introduzido no Canadá a partir do haplótipo H41, isolado na Austrália.

De acordo com o *UN Comtrade*, 330 suínos foram exportados da Austrália para o Canadá em transações comerciais que somaram 12,3 mil dólares nos anos de 1992 e 1995. Os haplótipos H22, H28 e H29 foram introduzidos a partir do haplótipo H23, isolado na Ásia (China) e Europa (Alemanha e França). A França está entre os principais países de origem das importações de suínos vivos tanto Canadá quanto dos Estados Unidos e as transações comerciais da França com esses dois países somam, respectivamente, 902,3 mil dólares e 934,1 mil dólares.

No Caribe, a introdução do PCV-2 na suinocultura cubana aconteceu por meio do haplótipo H50, sendo o Canadá, de acordo com o *UN Comtrade*, o principal exportador de suínos vivos para Cuba. No ano de 2005, 14.162 animais suínos vivos originários do Canadá foram inseridos na suinocultura cubana, por meio de transações comerciais que movimentaram aproximadamente 6,8 milhões de dólares. Essas transações comerciais constituem a principal entrada de suínos vivos em Cuba e este evento possivelmente contribuiu para a emergência da PCVAD no país, recentemente identificada por Perez *et al.* (2009) e relacionada com o haplótipo H50.

3.4.4. Introdução e dispersão na África, América do Sul e Oceania

Na África, o haplótipo H105 foi isolado em casos de PMWS que ocorreram na África do Sul em 2001 (Drew *et al.*, 2004). Esse haplótipo também foi isolado na América do Norte, América do Sul e Ásia (Figura 3.3A). A análise do histórico comercial da África do Sul revelou que, em 1999, ocorreram importações de sêmen originárias de Iowa nos Estados Unidos e que este sêmen foi utilizado em inseminações até 2001 (Drew *et al.*, 2004), quando o haplótipo H105 foi identificado. Dessa maneira, o haplótipo H105 provavelmente foi introduzido na África do Sul a partir dos Estados Unidos (Figura 3.4).

Na América do Sul, os haplótipos classificados no genótipo PCV-2b foram introduzidos no continente a partir do haplótipo H38 e os haplótipos classificados no

genótipo PCV-2a foram introduzidos a partir do haplótipo H105. Esses dois haplótipos foram isolados no Brasil e são os ancestrais dos demais isolados virais sul-americanos. De acordo com o UN Comtrade, as principais importações de suínos vivos no Brasil são originadas do Canadá (3,3 milhões de dólares) e da França (2,1 milhões de dólares) (Tabela S3.2. Material Suplementar). Portanto, o haplótipo H38 deve ter sido introduzido no Brasil a partir do Canadá e da França e o haplótipo H105 a partir do Canadá (Tabela 3.4). Na Argentina, a introdução do PCV-2 na suinocultura possivelmente ocorreu a partir do Brasil, uma vez que o haplótipo H56 é descendente do haplótipo H38. O Brasil está entre os principais países de origem das importações de suínos realizadas pela Argentina e as transações comerciais entre esses dois países somam 2,2 milhões de dólares.

Na Oceania, a Austrália é um dos poucos países produtores de suínos que ainda é considerado livre da PMWS (Muhling *et al.*, 2006). Todos os haplótipos classificados no genótipo PCV-2a foram identificados em suínos saudáveis e sem sinais clínicos da PMWS, entre os anos 1999 e 2002 (Muhling *et al.*, 2006). A maioria desses isolados virais do PCV-2 foi introduzida na suinocultura australiana a partir do haplótipo H80, que é descendente do haplótipo espanhol H84. As outras duas vias de introdução do PCV-2 observadas na rede de haplótipos (Figura 3.3) são a partir do haplótipo H38 (no genótipo PCV-2b) e a partir do haplótipo H105 (no genótipo PCV-2a). De acordo com o UN Comtrade, não há registros do comércio de suínos vivos entre a Austrália e a Espanha. Por outro lado, a Austrália importou 970 suínos vivos dos Estados Unidos, entre os anos 1990 e 1996, por meio de transações comerciais que somaram 92,6 mil dólares. Esse é o principal registro relacionado à introdução de suínos vivos na Austrália e deve estar relacionado com a introdução do haplótipo H33 (PCV-2a), a partir do haplótipo H105, e do haplótipo H38 (PCV-2b), uma vez que H105 e H38 foram isolados nos Estados Unidos.

3.4.5. Controlando a dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial

Muitos fatores relacionados à transmissão e à patogênese do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) contribuem para a sua rápida dispersão dentro da suinocultura mundial. O PCV-2 é um vírus estável e resistente ao ambiente das granjas e possui grande capacidade de dispersão nos sistemas de produção de suínos, por meio do contato direto com os animais infectados (via oro nasal, fecal e urinária), da transmissão vertical das

porcas para os leitões e do o sêmen contaminado (Opriessnig *et al.*, 2007; Madec *et al.*, 2008). Deslocamentos de massas de ar entre granjas vizinhas e fazendas próximas também podem contribuir para a dispersão do PCV-2, uma vez que concentrações de até 10^7 genomas de PCV-2 por metro cúbico de ar foram encontradas em ambientes de granjas comerciais de suínos por Verreault *et al.* (2009). Devido a essas características relacionadas à transmissão e à infecção pelo PCV-2, estima-se que todo suíno será infectado pelo PCV-2, no mínimo, em algum momento do ciclo de vida do animal (Darwich *et al.*, 2008).

Entretanto, o mais importante a se considerar é que o desenvolvimento de candidatos vacinais cada vez mais eficientes para o controle da infecção pelo PCV-2 e da patogênese da PMWS (Fort *et al.*, 2009; Opriessnig *et al.*, 2009; Segales *et al.*, 2009; Silva-Júnior *et al.*, 2009; Perez-Martin *et al.*, 2010) tem possibilitado a maior circulação de suínos sadios, mas subclínicamente infectados com o PCV-2. Dessa forma, a comercialização desses animais subclínicamente infectados e a seleção desses animais para programas de melhoramento genético, uma vez que o PCV-2 aparentemente pode ser transmitido pelo sêmen (Schmoll *et al.*, 2008) e da porca para os leitões, ganham destaque como importantes mecanismos pelos quais o PCV-2 alcançou uma distribuição mundial.

Dentro dessa perspectiva, o controle mais eficiente do comércio de suínos poderia ser alcançado por meio do diagnóstico molecular dos lotes de animais e de sêmen a serem comercializados. Considerando que a maioria dos rebanhos de suínos, se não todos, estão infectados com o PCV-2, a seleção de animais livres do vírus seria inviável. Entretanto, outros parâmetros como a determinação da carga viral das amostras analisadas e o diagnóstico de agentes co-infecciosos relacionados à PMWS poderiam ser utilizados para controlar a disseminação do PCV-2 por meio de transações comerciais entre os países produtores de suínos.

Neste trabalho, as correlações observadas entre as vias de dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial previstas em um contexto filogeográfico e as estatísticas do comércio internacional de suínos vivos mostram a importância do movimento de animais no rebanho mundial para a emergência de novos patógenos e a necessidade da criação de barreiras sanitárias cada vez mais eficazes no comércio de animais.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, D. J.; ROH, I. S.; SONG, D. S.; PARK, C. K.; PARK, B. K. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 115-22, 2007.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, 2000. 464 ISBN 0674666380.

AYLOR, D. L.; PRICE, E. W.; CARBONE, I. SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. **Bioinformatics**, v. 22, n. 11, p. 1399-401, 2006.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

CHEN, K.; BAXTER, T.; MUIR, W. M.; GROENEN, M. A.; SCHOOK, L. B. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 153-65, 2007.

CHEUNG, A. K.; LAGER, K. M.; KOHUTYUK, O. I.; VINCENT, A. L.; HENRY, S. C.; BAKER, R. B.; ROWLAND, R. R.; DUNHAM, A. G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Archives of Virology**, v. 152, n. 5, p. 1035-44, 2007.

CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K. S.; VIDIGAL, P. M.; SILVA, F. M.; CASTRO, L. A.; FIETTO, J. L.; SILVA, A., JR.; ALMEIDA, M. R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Virus Research**, v. 140, n. 1-2, p. 57-63, 2009.

CSAGOLA, A.; KECSKEMETI, S.; KARDOS, G.; KISS, I.; TUBOLY, T. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. **Archives of Virology**, v. 151, n. 3, p. 495-507, 2006.

DARWICH, L.; SEGALES, J.; RESENDES, A.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; MATEU, E. Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV-2). **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 194-8, 2008.

DE BOISSESON, C.; BEVEN, V.; BIGARRE, L.; THIERY, R.; ROSE, N.; EVENO, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 2, p. 293-304, 2004.

DREW, T. W.; GRIERSON, S. S.; KING, D. P.; HICKS, D.; DONE, S.; NESER, J. A.; EVANS, D. P.; GRIMBEEK, P.; BANKS, M. Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. **Veterinary Record**, v. 155, n. 5, p. 149-51, 2004.

DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BAEKBO, P.; LARSEN, L. E. Genomic analysis of PCV-2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 56-64, 2008.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. 2. Sinauer Associates, 2003. 664 ISBN 0878931775.

FIRTH, C.; CHARLESTON, M. A.; DUFFY, S.; SHAPIRO, B.; HOLMES, E. C. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12813-21, 2009.

FORT, M.; SIBILA, M.; PEREZ-MARTIN, E.; NOFRARIAS, M.; MATEU, E.; SEGALÉS, J. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV-2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV-2 viremia in an experimental model. **Vaccine**, v. 27, n. 30, p. 4031-7, 2009.

GAGNON, C. A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P.; VENNE, M. H.; HOUDE, A.; ELAHI, S. M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p. 811-9, 2007.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 23-35, 2008.

GRIERSON, S. S.; KING, D. P.; WELLENBERG, G. J.; BANKS, M. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 3, p. 265-8, 2004.

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.

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

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-5, 2001.

KIMURA, M. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 63, n. 4, p. 1181-8, 1969.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV-2) strains from cases presenting various clinical conditions. **Virus Research**, v. 90, n. 1-2, p. 101-12, 2002.

LARSON, G.; DOBNEY, K.; ALBARELLA, U.; FANG, M.; MATISOO-SMITH, E.; ROBINS, J.; LOWDEN, S.; FINLAYSON, H.; BRAND, T.; WILLERSLEV, E.; ROWLEY-CONWY, P.; ANDERSSON, L.; COOPER, A. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1618-21, 2005.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-2, 2009.

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, n. 13, p. 8262-74, 2005.

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 5065-73, 2006.

LOHSE, L.; BOTNER, A.; HANSEN, A. S.; FREDERIKSEN, T.; DUPONT, K.; CHRISTENSEN, C. S.; BAEKBO, P.; NIELSEN, J. Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1-2, p. 97-107, 2008.

MADEC, F.; ROSE, N.; GRASLAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV-2-related problems in pigs: a 12-year experience. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, n. 7, p. 273-83, 2008.

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, n. 2, p. 81-8, 2004.

MANOKARAN, G.; LIN, Y. N.; SOH, M. L.; LIM, E. A.; LIM, C. W.; TAN, B. H. Detection of porcine circovirus type 2 in pigs imported from Indonesia. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 1-2, p. 165-70, 2008.

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 (Pt 9), p. 2171-9, 1998.

MORRIS, K. First pig-to-human transmission of Ebola-Reston virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 148-148, 2009.

MUHLING, J.; RAYE, W. S.; BUDDLE, J. R.; WILCOX, G. E. Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 12, p. 421-5; discussion 416, 2006.

NICHOL, S. T.; ARIKAWA, J.; KAWAOKA, Y. Emerging viral diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12411-2, 2000.

NYLANDER, J. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic Biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology**, v. 357, n. 2, p. 175-85, 2007.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; MADSON, D. M.; PAL, N.; HALBUR, P. G. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV-2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV-2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1002-7, 2009.

PEREZ-MARTIN, E.; GOMEZ-SEBASTIAN, S.; ARGILAGUET, J. M.; SIBILA, M.; FORT, M.; NOFRARIAS, M.; KURTZ, S.; ESCRIBANO, J. M.; SEGALES, J.; RODRIGUEZ, F. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV-2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. **Vaccine**, 2010.

PEREZ, L. J.; DIAZ DE ARCE, H.; PERCEDO, M. I.; DOMINGUEZ, P.; FRIAS, M. T. First report of porcine circovirus type 2 infections in Cuba. **Research in Veterinary Science**, 2009.

PISTL, J.; NOVÁČKOVÁ, M.; JACKOVÁ, A.; POLLÁKOVÁ, J.; LEVKUT, M.; VILČEK, Š. First evidence of porcine circovirus 2 (PCV-2) in Slovakia. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 116, n. 1, p. 19-23, 2009.

PRICE, E. W.; CARBONE, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 402-4, 2005.

RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2009.

SCHMOLL, F.; LANG, C.; STEINRIGL, A. S.; SCHULZE, K.; KAUFFOLD, J. Prevalence of PCV-2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 814-21, 2008.

SEGALES, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**, v. 162, n. 26, p. 867-8, 2008.

SEGALES, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A.; BRU, T.; CRISCI, E.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S.; BALASCH, M.; SIBILA, M.; XU, Z.; CHU, H. J.; FRAILE, L.; PLANA-DURAN, J. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV-2) improves clinical, pathological and virological outcomes in

postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. **Vaccine**, v. 27, n. 52, p. 7313-21, 2009.

SILVA-JÚNIOR, A.; CASTRO, L. A.; NETO, O. C.; SILVA, F. M. F.; VIDIGAL, P. M. P.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 76-82, 2009.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-7, 2002.

TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I. M.; WIKSTROM, F. H.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; MCMENAMY, M.; MCNEILLY, F.; FUXLER, L.; BELAK, K.; PODERSOO, D.; SAAR, T.; BERG, M.; FOSSUM, C. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV-2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Virus Genes**, v. 36, n. 3, p. 509-20, 2008.

VERREAULT, D.; LETOURNEAU, V.; GENDRON, L.; MASSE, D.; GAGNON, C. A.; DUCHAINE, C. Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings. **Veterinary Microbiology**, 2009.

VIGRE, H.; BAEKBO, P.; JORSAL, S. E.; BILLE-HANSEN, V.; HASSING, A. G.; ENOE, C.; BOTNER, A. Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1-2, p. 17-26, 2005.

3.6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S3.1. Sequências completas de genomas do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) selecionadas no GenBank. As sequências genômicas dos isolados do PCV-2 foram agrupadas em 107 haplótipos e identificadas de acordo com o país de origem e a classificação filogenética. Esta tabela também lista os códigos de acesso das sequências dos genomas no GenBank. Os códigos de acesso marcados com um asterisco (*) correspondem aos isolados do PCV-2 que definem os genótipos propostos por Segales *et. al* (2008).

Código do haplótipo	Frequência	País de origem	Classificação filogenética	Código de acesso no GenBank
H1	1	Dinamarca	PCV-2c	EU148503*
H2	1	Austrália	PCV-2a	AY754017
H3	1	Brasil	PCV-2a	EU057187
H4	1	Brasil	PCV-2b	EU057185
H5	1	Brasil	PCV-2a	EU057184
H6	1	Brasil	PCV-2b	DQ364650
H7	1	Eslováquia	PCV-2b	EU545551
H8	1	Canadá	PCV-2a	AF109398
H9	1	Canadá	PCV-2a	AF112862
H10	1	Taiwan	PCV-2a	AF364094
H11	1	Canadá	PCV-2a	AF086835
H12	1	China	PCV-2a	EF524542
H13	2	China	PCV-2b	EF675238
H13	2	China	PCV-2b	EF675243
H14	1	Estados Unidos	PCV-2b	EU340258
H15	1	Japão	PCV-2a	AB072303
H16	1	Dinamarca	PCV-2b	EF565361
H17	1	Grécia	PCV-2a	DQ915588
H18	1	Grécia	PCV-2b	DQ915587
H19	1	Taiwan	PCV-2a	AF465211
H20	1	Canadá	PCV-2a	AF055392*
H21	1	Japão	PCV-2a	AB072302
H22	1	Canadá	PCV-2a	AF109399
H23	4	Alemanha	PCV-2a	AF201305
H23	4	Alemanha	PCV-2a	AF201306
H23	4	China	PCV-2a	AF381176
H23	4	França	PCV-2a	AY322004
H24	1	Hungria	PCV-2a	AY874166
H25	1	China	PCV-2a	EF524533

H26	2	China	PCV-2b	AY682992
H26	2	China	PCV-2b	EU418627
H27	1	Brasil	PCV-2a	EU057186
H28	1	Estados Unidos	PCV-2a	DQ870484
H29	1	Estados Unidos	PCV-2a	AF264043
H30	1	Hungria	PCV-2a	AY874165
H31	2	China	PCV-2b	EU647557
H31	2	China	PCV-2b	EU780073
H32	1	Canadá	PCV-2a	AF027217
H33	1	Austrália	PCV-2a	AY754022
H34	1	China	PCV-2b	AY651850
H35	1	Hungria	PCV-2a	AY874164
H36	1	Hungria	PCV-2a	AY874169
H37	1	Dinamarca	PCV-2a	EU148507
H38	132	França	PCV-2b	AF055394*
H38	132	Holanda	PCV-2b	AF201897
H38	132	China	PCV-2b	AF538325
H38	132	China	PCV-2b	AY181945
H38	132	China	PCV-2b	AY188355
H38	132	China	PCV-2b	AY217743
H38	132	China	PCV-2b	AY288134
H38	132	China	PCV-2b	AY291316
H38	132	França	PCV-2b	AY321984
H38	132	França	PCV-2b	AY321985
H38	132	França	PCV-2b	AY321986
H38	132	França	PCV-2b	AY321987
H38	132	França	PCV-2b	AY321988
H38	132	França	PCV-2b	AY321989
H38	132	França	PCV-2b	AY321990
H38	132	França	PCV-2b	AY321991
H38	132	França	PCV-2b	AY321992
H38	132	França	PCV-2b	AY321994
H38	132	França	PCV-2b	AY321995
H38	132	França	PCV-2b	AY321999
H38	132	França	PCV-2b	AY322000
H38	132	França	PCV-2b	AY322001
H38	132	França	PCV-2b	AY322002
H38	132	China	PCV-2b	AY391729
H38	132	Áustria	PCV-2b	AY424404
H38	132	Áustria	PCV-2b	AY424405
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484408
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484409
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484411
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484412

H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484413
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484414
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484415
H38	132	Holanda	PCV-2b	AY484416
H38	132	China	PCV-2b	AY536755
H38	132	China	PCV-2b	AY536756
H38	132	China	PCV-2b	AY604430
H38	132	China	PCV-2b	AY641542
H38	132	China	PCV-2b	AY682990
H38	132	China	PCV-2b	AY682995
H38	132	China	PCV-2b	AY691169
H38	132	China	PCV-2b	AY732494
H38	132	China	PCV-2b	AY849938
H38	132	Hungria	PCV-2b	AY874163
H38	132	China	PCV-2b	AY969004
H38	132	China	PCV-2b	DQ017036
H38	132	China	PCV-2b	DQ180392
H38	132	Canadá	PCV-2b	DQ220737
H38	132	Canadá	PCV-2b	DQ220738
H38	132	Hungria	PCV-2b	DQ648031
H38	132	China	PCV-2b	DQ910865
H38	132	Brasil	PCV-2b	DQ923523
H38	132	Brasil	PCV-2b	DQ923524
H38	132	China	PCV-2b	EF421973
H38	132	Estados Unidos	PCV-2b	EF452350
H38	132	Estados Unidos	PCV-2b	EF452351
H38	132	China	PCV-2b	EF493840
H38	132	China	PCV-2b	EF524516
H38	132	China	PCV-2b	EF524519
H38	132	China	PCV-2b	EF524521
H38	132	China	PCV-2b	EF524522
H38	132	China	PCV-2b	EF524525
H38	132	China	PCV-2b	EF524528
H38	132	China	PCV-2b	EF524530
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565342
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565343
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565344
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565345
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565346
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565347
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565349
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565350
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565351
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565352

H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565353
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565355
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565356
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565358
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565359
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565362
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565363
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565364
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565365
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565366
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565367
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EF565368
H38	132	China	PCV-2b	EF675234
H38	132	China	PCV-2b	EF675235
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136712
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136713
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136714
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136715
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136716
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136718
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136719
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	EU136720
H38	132	China	PCV-2b	EU257513
H38	132	China	PCV-2b	EU257514
H38	132	China	PCV-2b	EU366324
H38	132	China	PCV-2b	EU366325
H38	132	China	PCV-2b	EU366326
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450584
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450588
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450589
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450592
H38	132	China	PCV-2b	EU503031
H38	132	China	PCV-2b	EU503032
H38	132	China	PCV-2b	EU503035
H38	132	Eslováquia	PCV-2b	EU545542
H38	132	Eslováquia	PCV-2b	EU545548
H38	132	Eslováquia	PCV-2b	EU545549
H38	132	Eslováquia	PCV-2b	EU545550
H38	132	Austrália	PCV-2b	EU684164
H38	132	Austrália	PCV-2b	EU886637
H38	132	China	PCV-2b	EU921256
H38	132	China	PCV-2b	EU921257
H38	132	China	PCV-2b	FJ158605
H38	132	China	PCV-2b	FJ158606

H38	132	China	PCV-2b	FJ644561
H38	132	China	PCV-2b	FJ644563
H38	132	China	PCV-2b	FJ667594
H38	132	China	PCV-2b	FJ667595
H38	132	China	PCV-2b	FJ716703
H38	132	China	PCV-2b	FJ716704
H38	132	China	PCV-2b	FJ870969
H38	132	China	PCV-2b	FJ870974
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	FJ905462
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	FJ905464
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	FJ905466
H38	132	Coréia do Sul	PCV-2b	FJ905468
H38	132	Dinamarca	PCV-2b	FJ935780
H38	132	China	PCV-2b	GQ227412
H39	1	Dinamarca	PCV-2b	EF565354
H40	1	China	PCV-2b	AY579893
H41	3	Austrália	PCV-2a	AY754018
H41	3	Austrália	PCV-2a	AY754019
H41	3	Austrália	PCV-2a	AY754020
H42	25	China	PCV-2b	AY556475
H42	25	China	PCV-2b	DQ180393
H42	25	China	PCV-2b	DQ195679
H42	25	China	PCV-2b	DQ997817
H42	25	China	PCV-2b	EF421972
H42	25	China	PCV-2b	EF524535
H42	25	China	PCV-2b	EF675233
H42	25	China	PCV-2b	EF675240
H42	25	China	PCV-2b	EU095020
H42	25	China	PCV-2b	EU257512
H42	25	China	PCV-2b	EU366323
H42	25	China	PCV-2b	EU921255
H42	25	China	PCV-2b	FJ041151
H42	25	China	PCV-2b	FJ608538
H42	25	China	PCV-2b	FJ608539
H42	25	China	PCV-2b	FJ608540
H42	25	China	PCV-2b	FJ608542
H42	25	China	PCV-2b	FJ608543
H42	25	China	PCV-2b	FJ608544
H42	25	China	PCV-2b	FJ608546
H42	25	China	PCV-2b	FJ608549
H42	25	China	PCV-2b	FJ644922
H42	25	China	PCV-2b	FJ667584
H42	25	China	PCV-2b	FJ667587
H42	25	China	PCV-2b	FJ667592

H43	2	China	PCV-2b	AY181947
H43	2	China	PCV-2b	FJ158607
H44	2	China	PCV-2b	AY556476
H44	2	China	PCV-2b	AY686763
H45	1	Canadá	PCV-2a	AF117753
H46	1	Austrália	PCV-2a	AY754016
H47	1	China	PCV-2a	AY288135
H48	1	Canadá	PCV-2b	FJ233910
H49	1	Canadá	PCV-2b	DQ220732
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220727
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220728
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220729
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220730
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220731
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220734
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220735
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220736
H50	31	Canadá	PCV-2b	DQ220739
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	DQ629115
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	DQ629116
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	DQ629117
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	DQ629118
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	DQ629119
H50	31	Canadá	PCV-2b	EF394777
H50	31	Canadá	PCV-2b	EF394778
H50	31	Canadá	PCV-2b	EF394779
H50	31	Canadá	PCV-2b	EU340257
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	EU589463
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	EU594437
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	EU594438
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	EU594439
H50	31	Estados Unidos	PCV-2b	EU594440
H50	31	Canadá	PCV-2b	FJ233905
H50	31	Canadá	PCV-2b	FJ233906
H50	31	Canadá	PCV-2b	FJ233907
H50	31	Cuba	PCV-2b	FN398022
H50	31	Cuba	PCV-2b	FN398023
H50	31	Cuba	PCV-2b	FN398024
H50	31	Cuba	PCV-2b	FN398025
H50	31	Cuba	PCV-2b	FN398027
H51	1	China	PCV-2b	EF524520
H52	1	China	PCV-2b	AY613854
H53	1	China	PCV-2b	AY686764
H54	1	China	PCV-2b	AY686762

H55	1	China	PCV-2b	AY578327
H56	1	Argentina	PCV-2b	EF458306
H57	1	Taiwan	PCV-2a	AY180397
H58	1	Taiwan	PCV-2a	AY180396
H59	1	Taiwan	PCV-2a	AY146991
H60	1	Taiwan	PCV-2a	AY146993
H61	1	Japão	PCV-2a	AB426905
H62	1	Taiwan	PCV-2a	AF154679
H63	1	Taiwan	PCV-2a	AF166528
H64	1	Dinamarca	PCV-2b	EF565357
H65	4	Áustria	PCV-2a	AY424401
H65	4	Áustria	PCV-2a	AY424402
H65	4	Áustria	PCV-2a	AY424403
H65	4	China	PCV-2a	FJ501957
H66	1	Grécia	PCV-2b	DQ915583
H67	1	China	PCV-2b	DQ910866
H68	7	França	PCV-2b	AY321997
H68	7	França	PCV-2b	AY321998
H68	7	Romênia	PCV-2b	DQ233257
H68	7	Eslováquia	PCV-2b	EU545543
H68	7	Eslováquia	PCV-2b	EU545544
H68	7	Eslováquia	PCV-2b	EU545545
H68	7	Eslováquia	PCV-2b	EU545546
H69	1	Eslováquia	PCV-2b	EU545547
H70	1	China	PCV-2a	EF524518
H71	1	Dinamarca	PCV-2a	EU136711
H72	1	Alemanha	PCV-2a	AF201307
H73	1	Austrália	PCV-2a	AY754021
H74	2	China	PCV-2a	DQ104421
H74	2	China	PCV-2a	DQ104423
H75	1	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450587
H76	1	China	PCV-2a	FJ660969
H77	1	China	PCV-2b	EF421969
H78	2	China	PCV-2b	DQ201640
H78	2	China	PCV-2b	DQ206444
H79	12	China	PCV-2b	AY291317
H79	12	China	PCV-2b	AY556473
H79	12	China	PCV-2b	AY682991
H79	12	China	PCV-2b	AY943819
H79	12	China	PCV-2b	EF675230
H79	12	China	PCV-2b	FJ594471
H79	12	China	PCV-2b	FJ644929
H79	12	China	PCV-2b	FJ667583
H79	12	China	PCV-2b	FJ667588

H79	12	China	PCV-2b	FJ712216
H79	12	China	PCV-2b	FJ870970
H79	12	China	PCV-2b	FJ870973
H80	1	Austrália	PCV-2a	EU886638
H81	1	China	PCV-2a	AY556474
H82	3	China	PCV-2b	DQ104422
H82	3	China	PCV-2b	FJ644920
H82	3	China	PCV-2b	FJ644921
H83	2	Espanha	PCV-2a	AF201308
H83	2	Espanha	PCV-2a	AF201310
H84	1	Espanha	PCV-2a	AF201309
H85	1	China	PCV-2b	DQ104420
H86	1	Taiwan	PCV-2a	AY146992
H87	2	Indonésia	PCV-2b	EU302139
H87	2	Indonésia	PCV-2b	EU302140
H88	1	França	PCV-2b	AY321996
H89	1	Dinamarca	PCV-2b	EF565348
H90	1	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450585
H91	1	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450590
H92	1	Coréia do Sul	PCV-2b	EU450586
H93	1	Estados Unidos	PCV-2a	AF264041
H94	2	Canadá	PCV-2a	AF085695
H94	2	Canadá	PCV-2a	AF086836
H95	1	Canadá	PCV-2a	AF086834
H96	1	Canadá	PCV-2b	DQ220733
H97	1	Coréia do Sul	PCV-2a	AF544024
H98	1	China	PCV-2a	AF381177
H99	1	Coréia do Sul	PCV-2a	AF454546
H100	1	Canadá	PCV-2a	EF394776
H101	1	Canadá	PCV-2a	EF394775
H102	3	Estados Unidos	PCV-2a	DQ629113
H102	3	Estados Unidos	PCV-2a	DQ629114
H102	3	Estados Unidos	PCV-2a	FJ218001
H103	1	Estados Unidos	PCV-2a	FJ218002
H104	1	Canadá	PCV-2a	FJ233908
H105	12	Canadá	PCV-2a	AF118097
H105	12	Estados Unidos	PCV-2a	AF264038
H105	12	Estados Unidos	PCV-2a	AF264039
H105	12	Coréia do Sul	PCV-2a	AF520783
H105	12	South Africa	PCV-2a	AY325495
H105	12	Estados Unidos	PCV-2a	AY699793
H105	12	Canadá	PCV-2a	EF394774
H105	12	China	PCV-2a	EF524538
H105	12	China	PCV-2a	EF524540

H105	12	Brasil	PCV-2a	EU057188
H105	12	Brasil	PCV-2a	EU057189
H105	12	Coréia do Sul	PCV-2a	EU450591
H106	1	Estados Unidos	PCV-2a	AY094619
H107	9	Japão	PCV-2a	AB072301
H107	9	Canadá	PCV-2a	AF118095
H107	9	Estados Unidos	PCV-2a	AF264040
H107	9	Estados Unidos	PCV-2a	AF264042
H107	9	China	PCV-2a	AF381175
H107	9	Canadá	PCV-2a	AF408635
H107	9	China	PCV-2a	AY181948
H107	9	Estados Unidos	PCV-2a	EF452352
H107	9	Estados Unidos	PCV-2a	EF452353

Tabela S3.2. Resumo das estatísticas econômicas do comércio de suínos (mercadoria 0103) no banco de dados UN Comtrade.

País	Fluxo	Valor das Transações*#	Parceiro
Alemanha	Importação	\$2.559.059.304,00	Dinamarca
		\$109.223.034,00	França
Argentina	Importação	\$2.211.500,00	Brasil
Austrália	Importação	\$96.245,00	Estados Unidos
Áustria	Importação	\$9.995.175,00	Holanda
Brasil	Importação	\$3.257.860,00	Canadá
		\$2.125.889,00	França
Canadá	Exportação	\$5.350.170,00	Cuba
		\$6.331.283.361,00	Estados Unidos
	Importação	\$902.203,00	França
		\$13.379.898,00	Estados Unidos
China	Importação	\$15.717.631,00	Canadá
		\$9.643.478,00	Dinamarca
		\$25.468.200,00	Estados Unidos
		\$3.605.224,00	França
		\$62.070.086,00	World
Coréia do Sul	Importação	\$12.731.219,00	Canadá
		\$5.301.832,00	Dinamarca
		\$25.323.731,00	Estados Unidos
Dinamarca	Exportação	\$5.640.022,00	China
	Importação	\$1.655.331,00	Alemanha

Eslováquia	Importação	\$146.283,00	França
		\$3.883.629,00	Dinamarca
		\$10.907.329,00	Holanda
		\$8.087.509,00	Hungria
Estados Unidos	Importação	\$934.149,00	França
França	Exportação	\$129.336.098,00	Holanda
Grécia	Importação	\$889.565,00	Alemanha
		\$3.894.988,00	Dinamarca
		\$5.597.455,00	França
		\$16.131.157,00	Holanda
		\$8.871.645,00	Hungria
Holanda	Exportação	\$404.866.046,00	França
Hungria	Importação	\$147.622.000,00	Holanda
Indonésia	Exportação	\$57.738,00	China
		\$462.335.258,00	Cingapura
	Importação	\$3.503.445,00	Austrália
		\$865.881,00	Estados Unidos
Japão	Importação	\$524.651,00	Austrália
		\$2.061.904,00	Canadá
		\$17.223.516,00	Estados Unidos
Romênia	Importação	\$7.340.462,00	França

***Fontes dos dados:** *United Nations Comtrade database, DESA/UNSD* (<http://comtrade.un.org/>. Acessado em 1 de junho de 2010). # **Somatório das transações comerciais entre 1989 e 2009.** As importações relatadas por um país podem não coincidir com as exportações relatadas pelo seu parceiro comercial e estas diferenças são devidas a uma série de fatores. Entretanto, estas estatísticas nos fornecem algumas informações sobre o comércio entre os países.

CAPÍTULO 4

Conclusões Gerais

Genótipos versus grupos filogenéticos: Uma análise comparativa dos modelos de classificação do *Porcine circovirus-2* (PCV-2).

- Tanto nas análises de *mismatch distribution* quanto nas análises filogenéticas, os agrupamentos formados e as variações observadas foram muito semelhantes.
- As análises mostram a sobreposição entre os agrupamentos em genótipos e em subgrupos filogenéticos. O genótipo PCV-2a foi correspondente ao Grupo 2 e reuniu os subgrupos 2A, 2B, 2C, 2D e 2E. O genótipo PCV-2b foi correspondente ao Grupo 1 e reuniu os subgrupos 1A, 1B e 1C. O genótipo PCV-2c reuniu apenas a sequência do isolado viral que o define.
- As sequências da ORF1 não são marcadores adequados para a classificação dos isolados virais do PCV-2 em genótipos e em subgrupos filogenéticos. Entretanto, a subdivisão dos genótipos PCV-2a e PCV-2b nas análises de *mismatch distribution* e a diferenciação entre os subgrupos 1A e 1B nas análises filogenéticas somente se tornaram evidentes quando as sequências da ORF1 também foram consideradas.
- A utilização das sequências da ORF1 e ORF2 concatenadas é a melhor estratégia para a correta classificação dos isolados virais do PCV-2 em genótipos e em subgrupos filogenéticos.

Tropeçando em patógeno emergente em todo o mundo: uma abordagem filogeográfica do *Porcine circovirus-2* (PCV-2) considerando o mercado mundial.

- As variantes virais do PCV-2 estão amplamente distribuídas entre os países produtores de suínos, sendo encontrados representantes dos genótipos PCV-2a e PCV-2b na Ásia, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania.
- As seguintes vias de dispersão do PCV-2 entre os países produtores de suínos foram preditas considerando as estatísticas do *UN Comtrade* e o histórico epidemiológico dos isolados virais: América do Norte → África, América do Norte →

América do Sul, América do Norte → Caribe, Europa → América do Norte, Europa → América do Sul, Europa → Ásia, Oceania → Ásia e Oceania → América do Norte.

- Os principais países de origem das rotas de dispersão do PCV-2 são o Canadá, os Estados Unidos, a Dinamarca, a França e a Holanda. Nesses países estão localizadas sedes de importantes empresas que atuam no melhoramento genético de suínos, sendo grandes exportadores de animais no comércio internacional de suínos vivos.
- O haplótipo H38 apresentou o maior número de ramificações na rede de haplótipos, sendo o ancestral dos demais isolados virais classificados no genótipo PCV-2b. Por essas razões, esse haplótipo pode ser considerado o principal responsável pela disseminação das linhagens virais do genótipo PCV-2b na suinocultura mundial.
- O papel da suinocultura chinesa na dispersão global do PCV-2 entre os países suinocultores pode estar restrito a uma distribuição regional entre os países asiáticos.
- Na América do Norte, é mais provável que os eventos de introdução do PCV-2 tenham ocorrido a partir do Canadá e depois em direção aos Estados Unidos.
- No Caribe, a introdução do PCV-2 na suinocultura cubana ocorreu a partir do Canadá.
- Na África, a introdução do PCV-2 na suinocultura sul-africana ocorreu a partir dos Estados Unidos.
- As correlações observadas entre as vias de dispersão do PCV-2 na suinocultura mundial preditas em um contexto filogeográfico e as estatísticas do comércio internacional de suínos vivos mostram a importância do movimento de animais no rebanho mundial para a emergência de novos patógenos e a necessidade da criação de barreiras sanitárias cada vez mais eficazes no comércio de animais.